

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



**REZISTENCE BAKTERIÍ RODU *PSEUDOMONAS*
K ANTIBIOTIKŮM**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. MARCELA VEJSOVÁ, Ph. D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

LUKÁŠ GOLD

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval vedoucí práce Mgr. Marcele Vejsové, Ph. D. za cenné rady a připomínky, jak při tvorbě práce, tak i při její celkové úpravě. A MUDr. Evě Chudáčkové z Ústavu mikrobiologie ve FN v Plzni za pomoc při získání MALDI – TOF spekter.

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 18. 4. 2014

Podpis:

Obsah

Obsah	4
Souhrn.....	7
Abstract.....	8
1. SEZNAM ZKRATEK	9
2. ÚVOD.....	10
3. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	11
4. OBECNÉ VLASTNOSTI RODU <i>PSEUDOMONAS</i>	12
4. 1 Morfologie pseudomonád.....	12
4. 2 Antigenní struktura	12
4. 3 Patogenita rodu <i>Pseudomonas</i>	13
4. 3. 1 Exopolysacharid (Alginát).....	13
4. 3. 2 Exotoxiny	13
4. 3. 3 Exoenzym S (ExoS)	13
4. 3. 4 Hemolyziny	14
4. 3. 5 Proteázy	14
4. 4 Produkce pigmentů	15
4. 4. 1 Pyocyanin	15
4. 5 Produkce bakteriocinů	16
4. 5. 1 Pyocin	16
4. 5. 1. 1 Bakteriocidní aktivita pyocinu	16
4. 6 Tvorba biofilmu	17
4. 7 Taxonomické rozdělení	18
5. KULTIVACE BAKTERIÍ RODU <i>PSEUDOMONAS</i>	19
5. 1 Kultivace na krevním agaru.....	19
5. 2 Kultivace na ENDO agaru	19
5. 3 Selektivní agary k záchytu pseudomonád	20
5. 3. 1 Pseudomonádový izolační agar	20
5. 3. 2 Cetrimidový agar	20
5. 3. 3 Pseudomonádový agar C-N	20

6. IDENTIFIKACE BAKTERIÍ RODU PSEUDOMONAS	21
6. 1 Biochemická detekce cytochromoxidázy	21
6. 1. 1 Princip testu Mikro-La-Test OXItest.....	21
6. 1. 2 Jednoduchý procesní přehled Mikro-La-Test OXItest	21
6. 2 Biochemická identifikace Mikro-La-Test NEFERMtest 24.....	22
6. 2. 1 Složení soupravy Mikro-La-Test NEFERMtest 24.....	22
6. 2. 2 Jednoduchý pracovní postup	23
6. 3 Biochemická identifikace krátkou řadou cukrů.....	24
6. 4 Biochemická identifikace pomocí VITEK systému	26
6. 4. 1 VITEK 2 systém	26
6. 4. 2 Hrubý procesní přehled	26
6. 5 MALDI-TOF MS	26
6. 5. 1 Princip a charakteristika metody	27
6. 5. 2 Jednoduchý procesní přehled	27
6. 5. 3 Analyzátor TOF.....	27
6. 5. 4 Hodnocení identifikace pomocí MALDI – TOF MS	28
6. 5. 5 Shrnutí identifikace bakteriálních izolátů pomocí techniky MALDI – TOF	29
6. 6 Molekulární techniky.....	30
6. 6. 1 PCR – polymerázová řetězová reakce	30
6. 6. 2 Jednoduchý procesní přehled klasické PCR.....	30
6. 6. 3 Real Time – PCR.....	31
6. 6. 4 PCR u pseudomonád	31
7. REZISTENCE A JEJÍ HLAVNÍ MECHANISMY.....	32
7. 1 Nepropustnost vnější membrány	32
7. 1. 1 Průnik antibiotik přes buněčnou membránu <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
7. 1. 2 Vnější membrána jako bariéra.....	33
7. 2 Role efluxního systému	34
7. 3 Produkce enzymů	35
7. 4 Alginát, biofilm a rezistence.....	35
7. 5 Změny v cíli.....	36
8. PRODUKCE KARBAPENEMÁZ A JEJICH DETEKCE	37
8. 1 β -laktamová antibiotika	37
8. 2 Rozdělení β -laktamáz	37

8. 3 Genetika β -laktamáz	38
8. 4 Metalo- β -laktamázy	38
8. 5 Inhibitory β -laktamáz	38
8. 6 Detekce karbapanemáz	39
8. 6. 1 Referenční metoda	39
8. 6. 2 Molekulární techniky	39
8. 6. 3 Fenotypové testy	39
8. 6. 3. 1 Hodge test	39
8. 6. 3. 2 CARBA NP test	40
8. 6. 4 Detekce pomocí MALDI – TOF	40
8. 6. 4. 1 Detekce degradačních produktů meropenemu	40
8. 6. 4. 2 Analýza spekter z MALDI – TOF	42
9. PSEUDOMONÁDOVÉ INFEKCE A JEJICH LÉČBA	43
9. 1 Nejčastěji zasažená místa	43
9. 2 Nozokomiální nákazy	44
9. 2. 1 Pneumonie	44
9. 2. 2 Infekce močových cest	44
9. 2. 3 Infekce krevního oběhu	44
9. 3 Terapie infekcí vyvolaných pseudomonádami	45
10. DISKUZE	47
11. ZÁVĚR	48
12. SEZNAM ORBÁZKŮ	49
13. SEZNAM TABULEK	50
14. POUŽITÁ LITERATURA	51
15. PŘÍLOHY	59

Souhrn

Lukáš Gold

Rezistence bakterií rodu *Pseudomonas* k antibiotikům

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotnická bioanalytika; Zdravotní laborant

Tato rešeršní práce vznikla za účelem základního shrnutí, poznatků o rezistenci bakterií rodu *Pseudomonas* k antibiotikům. Spojení mezi rezistencemi a jejich diagnostikou za využití nově využívaných technik, především hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF.

Pro uvedení do problematiky tohoto široce obsáhlého tématu jsme do práce zařadili kapitoly o obecných vlastnostech pseudomonád. To proto, aby byly objasněny mechanismy vzniku rezistence k antibiotikům. Část rešerše patří také laboratorní diagnostice s využitím klasických fenotypových metod a nově využívaných technik hlavně hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF. Částí práce jsou kapitoly o infekcích způsobenými rodem *Pseudomonas* a jejich doporučené terapii. Postavení rodu *Pseudomonas* jako jednoho z nozokomiálních patogenů je zmíněna obecněji.

Tato práce tedy obsahuje obecné poznatky o pseudomonádách, na které navazuje vysvětlení problematiky o rezistencích k antibiotikům – především o mechanismech rezistencí a produkci karbapenemáz, kterou lze detekovat díky technice MALDI – TOF.

**Klíčová slova: PSEUDOMONÁDY, REZISTENCE K ANTIBIOTIKŮM,
KARBAPENEMÁZY**

Abstract

Lukáš Gold

The resistance of *Pseudomonas* bacteria species to antibiotics

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Medical laboratory technician

This work was focused on summarising the basic knowledge on the resistance of *Pseudomonas* bacteria species to antibiotics, and the connection between their resistance and their diagnostics using new techniques, especially the mass spectrometry MALDI – TOF.

As an introduction to this very extensive topic, we included a chapter on the general characteristics of *Pseudomonas*, in order to clarify the mechanisms by which resistance to antibiotics arise. Part of this review also includes laboratory diagnosis using conventional phenotypic methods as well as new techniques, mainly using the mass spectrometry MALDI – TOF. A small and yet considerably significant section of the work includes chapters on the infections caused by the *Pseudomonas* species and their recommended therapies. The position of the *Pseudomonas* species as one of the nosocomial pathogens is generally made mention of in this work.

This review therefore, contains general information on *Pseudomonas* species that are related to their resistance to antibiotics, and mainly pertaining to their mechanisms of resistance and production of carbapenemases, which can be detected by MALDI – TOF techniques.

Keywords: PSEUDOMONAS, ANTIBIOTIC RESISTANCE, CARBAPENEMASES

1. SEZNAM ZKRATEK

ARO	Anesteriologicko resuscitační oddělení
BAL	Bronchoalveolární laváž
Bp	Páry bází
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Etylendianintetraoctová kyselina
HISU	Hajny, Indol, Simons, Urea
JIP	Jednotka intenzivní péče
MALDI	Matrix-assisted-desorption-ionization
MBL	Metalo- β -laktamáza
MHT	Modifikovaný Hodge test
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MS	Hmotnostní spektrometrie
MW	Relativní molekulová hmotnost
Na ⁺	Kation sodný
Opr	Porin
PBP	Penicilin vázající protein
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PE	Polyethylen
PMK	Permanentní močový katétr
PSAE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SOP	Standardní operační postup
TOF	Time-off-flight (čas letu)

2. ÚVOD

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou kultivačně a růstově nenáročné mikroorganismy, které kolonizují přírodní i umělá prostředí. Fyziologicky kolonizují různé části lidského těla. Infekce vyvolávají především u imunokompromitovaných pacientů. A jsou příčinou nozokomiálních infekcí, díky schopnosti přilnout k různým materiálům – katétrů, cévky apod. Barvicí technikou dle Grama a mikroskopii se řadí mezi Gram negativní tyčinky. Díky své neschopnosti štěpit cukry jsou také nazývány jako Gram negativní nefermentující tyčinky. Ve vztahu ke kyslíku jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie. Hlavním zástupcem toho rodu je *Pseudomonas aeruginosa*. Jsou to bakterie, které vykazují pozoruhodné schopnosti odolávat antibiotikům a to díky různým mechanismům. Velmi znepokojivý je fakt, že tyto mechanismy často bývají přítomny současně, čímž vznikají multirezistentní kmeny, které představují vysoké riziko u imunokompromitovaných pacientů. Infekce vyvolávané pseudomonádami u těchto pacientů bývají často spojovány s vysokou mortalitou. Pro klinickou praxi je velmi důležité stanovení citlivosti pseudomonád k antibiotikům. Podstatou vlastní terapie je empirická léčba, která obvykle zahrnuje léčbu kombinovanou. Při těžkých infekcích je velmi důležitá spolupráce ošetřujícího lékaře a mikrobiologa, pro zahájení včasné terapie.

3. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této literární rešerše je obecná charakteristika rodu *Pseudomonas*. Objasnění mechanismů rezistence a genetická výbava. Stanovení citlivosti k antibiotikům. Důležitou částí je produkce karbapenemáz a jejich stanovení. Zjištění výskytu rezistencí za vybrané období. Závěrem by mělo být vyhodnocení výsledků, jejich interpretace a diskuze s využitím teoretických a praktických znalostí dané problematiky.

Obecná charakteristika rodu *Pseudomonas*.

Mechanismy rezistence - genetická výbava, plazmidy, transpozómy.

Stanovení citlivosti k antibiotikům.

Produkce karbapenemáz a metody stanovení.

Diskuze s využitím teoretických a praktických znalostí dané problematiky.

4. OBECNÉ VLASTNOSTI RODU *PSEUDOMONAS*

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou kosmopolitní Gram negativní tyčinky, izolované z půdy, vody, rostlin a živočichů včetně člověka. Jsou běžnými lidskými saprofyty. U zdravých jedinců způsobují onemocnění velmi zřídka. Nejznámějším zástupcem tohoto rodu je *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE).

4.1 Morfologie pseudomonád

Buněčná stěna Gram negativních bakterií je tenká (cca 10 nm), nemá vysokou hmotnost. Svým složením je daleko složitější, než je tomu u Gram pozitivních bakterií. Buněčnou stěnu tvoří tenká vrstva peptidoglykanu. Nad touto vrstvou je membrána, která je tvořena dvojrstvou fosfolipidů a bílkovinami. Tyto bílkoviny jsou navázány na obě strany fosfolipidové dvojrstvy. Nazývá se vnější membrána a je připevněna k peptidoglykanu molekulami lipoproteinů. Někdy mohou být obaleny vrstvou slizu, která napodobuje pouzdro. ^(5, 50)

Prostor mezi membránami se nazývá, periplazmatický prostor. Obsahuje řadu makromolekul, které se podílí na metabolické aktivitě Gram negativní bakterie.

U pseudomonád jsou v tomto prostoru uloženy β -laktamázy (enzymy, které hydrolyzují β -laktamová antibiotika).

Většina kmenů *Pseudomonas aeruginosa* se pohybuje pomocí jednoho polárního bičíku. Ovšem ne u všech bakterií toho rodu je polární, ale může být i subpolární. Některé kmeny vytvářejí kratší laterální bičíky (např.: *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*). Jedním z taxonomických znaků je právě počet a umístění bičíků.

Široké spektrum Gram negativních bakterií včetně rodu *Pseudomonas* tvoří fimbrie (pili) typu 4. Jsou složeny z malých strukturálních podjednotek a zodpovídají za adhezi na epitelie. ^(37, 49, 52)

4.2 Antigenní struktura

Pomocí sérotypizace je doposud rozlišeno 17 hlavních termostabilních somatických antigenů u *Pseudomonas aeruginosa*. Lipopolysacharid u PSAE obsahuje O-řetězce, složené ze 2 polysacharidových jednotek A a B. Vysoká molekulová hmotnost B jednotky určuje antigenní specifičnost bakterie. ^(31, 45)

4. 3 Patogenita rodu *Pseudomonas*

Na patogenitě bakterií rodu *Pseudomonas* se podílí několik faktorů. Jednak se může jednat o faktory, které jsou vázané na buňku. Nebo se může jednat o mimobuněčné – extracelulární produkty (hemolyziny, proteázy, exotoxiny), které přispívají k patogenitě. (5, 21, 50)

4. 3. 1 Exopolysacharid (Alginát)

Tento polysacharid produkují mukoidní kmeny pseudomonád, které kolonizují dýchací cesty pacientů např. s cystickou fibrózou. Přejít pseudomonády v mukoidní kmen může podpořit její přetrvání v dýchacích cestách těchto pacientů. Tvorba mukoidních kmenů je brána, jako obrana pseudomonád proti imunitnímu systému hostitele (obrana proti fagocytóze). (18)

4. 3. 2 Exotoxiny

Exotoxin je jednořetězcový toxin složený ze tří strukturálních domén a inhibuje syntézu proteinů. Jedná se o extracelulární ADP-ribosyl transferázu, která katalyzuje přenos ribosyl-ADP z NAD na elongační faktor 2. Tak vzniká inaktivní protein. Tento mechanismus je stejný jako u difterického toxinu. Exotoxin je brán jako hlavní faktor virulence u *Pseudomonas aeruginosa*, má smrtelné účinky pro myši a psy. Na buňky tkáňových kultur má cytotoxické účinky. (7, 21)

4. 3. 3 Exoenzym S (ExoS)

Jedná se také o extracelulární ADP-ribosyl transferázu pseudomonád. Ovšem odlišnou od exotoxinu A. Odlišnost je způsobena tím, že neupravuje elongační faktor 2, ale přímo proteiny. Je jeden z toxinů, který se podílí na kolonizaci a šíření rodu *Pseudomonas* během infekce. Může způsobovat poškození tkání při plicních infekcích a mění cytoskelet buňky. (7, 27)

4. 3. 4 Hemolyziny

Pseudomonas aeruginosa může produkovat dva typy hemolyzinů. Jedním z nich je termolabilní fosfolipáza C, která katalyzuje hydrolýzu fosfatidylcholinu (lecithinu). Výsledkem hydrolýzy je fosfocholin. Fosfolipáza C je důležitá pro zahájení infekce, zejména v plicích. Kde je právě dostatek substrátů ve formě fosfolipidů. Druhým z hemolyzinů, které může *Pseudomonas aeruginosa* produkovat, je termostabilní glykolipid.

Termostabilní glykolipid, je hemolyzin, který se podílí na infekcích očí a plic. Je složený z dvou molekul kyselých glykolipidů. Jeden z nich je rhamnolipid a druhý je také rhamnolipid ovšem s kyselinou β -hydroxydekanovou. Ta se podílí především na aktivitě hemolyzinu. ^(6, 32)

4. 3. 5 Proteázy

Proteázy jsou enzymy, které hrají důležitou roli v patogenezi pseudomonád. Většina pseudomonád produkuje proteázy, které mají odlišné pH optimum, izoelektrický bod a substrátovou specifíčnost.

Do skupiny proteáz patří:

- Endopeptidázy
- Elastázy
- Alkalické proteázy
- LasA (stafylolytická) proteáza
- Lysin specifické endopeptidázy

Tyto peptidázy se podílí na štěpení fibrinu, elastinu a kolagenu. Mohou tak poškozovat drobné cévy, což vede k dalšímu poškození tkání a ve finálním stádiu až k nekróze.

Elastáza a LasA proteáza mohou degradovat elastin. LasA proteáza má také stafylolytickou činnost, která vyplývá ze štěpení pentaglycinu v příčné vazbě s peptidoglykenem buněčné stěny. ^(5, 23, 47)

4. 4 Produkce pigmentů

Bakterie rodu *Pseudomonas* mohou tvořit veliké množství pigmentů. Syntéza zelenomodrého pyocyaninu a žlutozeleného fluoresceinu, které jsou rozpustné ve vodě, je charakteristickou vlastností právě některých pseudomonád. Patří mezi ně *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* a z fytopatogenů *Pseudomonas syringae*.

4. 4. 1 Pyocyanin

Pyocyanin (PCN) je modrozelený redox – aktivní sekundární metabolit, který patří do rodiny fenazinů.

Některé *in vitro* studie ukázaly, že PCN má škodlivé účinky většinou na savčí buňky. Podílí se na inhibici buněčného dýchání, uvolňuje prostacyklin z endoteliálních buněk plic, inaktivuje katalázu a díky uvolňování interleukinu 2 omezuje růst T – lymfocytů. Indukuje také apoptózu u neutrofilních segmentů a moduluje redoxní cyklus glutationu v epiteliálních a endoteliálních buňkách plic. PCN také inaktivuje inhibitor α_1 – proteázy a přispívá k nerovnováze mezi proteázovou a antiproteázovou činností, která je často detekována u pacientů s cystickou fibrózou plic.

Pro syntézu PCN jsou nutné dvě skupiny genových produktů. Nutný je VFR transkripční faktor pro aktivaci *phnAB*. Genové produkty *phnAB* syntetizují chinoliny, které regulují *phzRABCDEF* operony 1 a 2, tedy strukturální geny pro fenazin. ^(22, 25, 26, 42, 50)

4. 5 Produkce bakteriocinů

Bakteriociny jsou na ribozómech syntetizované proteiny produkované bakteriemi. Exprese těchto proteinů přináší producentům selekční výhodu oproti konkurenčním bakteriálním druhům sdílejícím stejnou mikroekologickou niku.

Na syntézu těchto proteinů působí řada faktorů, jako životní prostředí a růstové faktory. Zejména chemická povaha organického uhlíku, přístup vzduchu, pH, množství světla a kationty Mg^{2+} , Zn^{2+} a Fe^{3+} . Právě pyocin patří mimo jiné k faktorům virulence, proto zde bude zmíněn podrobněji. ⁽³⁴⁾

4. 5. 1 Pyocin

Pyocin produkují pyocinogeny. Jsou popsány 3 typy tohoto proteinu. Jako první byl popsán **R – pyocin**. Všechny typy R – pyocinu jsou nukleáza a proteáza rezistentní. Tyto vlastnosti usnadňují jeho purifikaci a přípravu specifického antiséra. Druhým typem je **F – pyocin**. Je známo, že je spojený s R – pyocinem. Je také rezistentní k účinku nukleáz a proteáz. Třetí je **S – pyocin**, který je proteáza citlivý. ^(33, 34)

4. 5. 1. 1 Bakteriocidní aktivita pyocinu

Bakteriocidní aktivitu má především R – pyocin. Ten zastavuje syntézu makromolekul v citlivých buňkách. Dojde k uvolnění intracelulárního materiálu a během 20 minut k buněčné smrti. Ta vyplývá z depolarizace cytoplazmatické membrány v souvislosti se vznikem pórů. R – pyocin je schopen „usmrtit“ jiné Gram negativní bakterie. Pyocin tedy může zajistit převahu daného bakteriálního kmene. ^(33, 34)

4. 6 Tvorba biofilmu

Biofilmy jsou strukturální bakteriální společenství buněk, uzavřených v samostatně produkovaných polymerních maticích. Jsou spjaté s živým nebo neživým povrchem. Biofilmy jsou tedy jedním z důvodů, že bakterie mohou přilnout k pevným povrchům a tvořit slizký a kluzký povlak. Biofilmy představují chráněný růstový režim, který umožňuje přežití v nepřátelském prostředí. Struktury vytvářející biofilm, obsahují kanály, kterými mohou protékat živiny. Více než polovina infekčních onemocnění, které postihují mírně kompromitované jedince, zahrnují bakterie, které jsou v komenzálním vztahu s lidským tělem.

Biofilmy se rozvíjí především na intertních površích nebo na odumřelých tkáních. Vyskytují se obvykle na lékařských nástrojích, katétrech, cévkách, ale vznikají také v živých tkáních. Tak je tomu např. u cystické fibrózy, kde je tvorba biofilmu v dýchacích cestách tvořenému *Pseudomonas aeruginosa* velkým rizikem.

Růst biofilmů je pomalý. Může probíhat na jednom či více místech. Přisedlé bakteriální buňky uvolňují antigeny a stimulují tvorbu protilátek. Protilátky nejsou účinné při „usmrcení“ bakterií v biofilmu, ale mohou způsobit komplexní imunitní poškození okolních tkání.⁽¹⁰⁾

4. 7 Taxonomické rozdělení

Uvádím zde taxonomické rozdělení podle NCBI databáze.

Bacteria,

 Proteobacteria,

 Grammaproteobacteria,

 Pseudomonadales,

 Pseudomonadaceae

Pseudomonas aeruginosa group

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas alcaligenes

Pseudomonas caeni

Pseudomonas flavescens

Pseudomonas jijuensis

Pseudomonas mendocina

Pseudomonas nitroreducens

Pseudomonas oleovorans

Pseudomonas pseudoalcaligenes

Pseudomonas cf. pseudoalcaligenes

Pseudomonas straminea

Pseudomonas Marici

Pseudomonas alcaliphia

Pseudomonas azotifigens

Pseudomonas brassicacearum

Pseudomonas chloraphis group

Pseudomonas fluorescens group

Pseudomonas putida group

Pseudomonas stutzeri group

Pseudomonas syringae group ⁽¹⁴⁾

5. KULTIVACE BAKTERIÍ RODU *PSEUDOMONAS*

Bakterie rodu *Pseudomonas*, jsou růstově a kultivačně nenáročné. Rostou při běžné kultivační teplotě 37°C. Bakterie tohoto rodu vztahem ke kyslíku řadíme mezi aerobní bakterie.

Mezi nejčastěji izolovaný a klinicky významný kmen tohoto rodu patří *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE).

Kultury narostlé po 18 – 24 hodinách mají charakteristický zápach, označovaný - jako jasmínový. ⁽⁵⁰⁾

5.1 Kultivace na krevním agaru

Krevní agar patří mezi základní kultivační média využívané v bakteriologických laboratořích (viz. Obr. 4 – přílohy).

Některé bakterie rodu *Pseudomonas* zde mají charakteristický růst – zóna úplné hemolýzy = β hemolýza. Jiné kmeny hemolýziny neprodukují a mohou vytvářet drobné šedavé kolonie nebo naopak mukózní – přímo tekuté – kolonie.

Kolonie často vytváří kovový lesk a v jejich přítomnosti je velmi často patrná pigmentace. ^(5, 50)

5.2 Kultivace na ENDO agaru

ENDO agar je selektivně diagnostické kultivační médium. Selektivita toho média spočívá v přítomnosti bazického fuchsinu odbarveného siřičitanem sodným. Ten působí jako inhibitor růstu Gram pozitivních bakterií. Zároveň působí jako indikátor štěpení laktózy. Laktóza je v agaru substrátem. Díky její přítomnosti rozlišujeme bakterie, které na agaru rostou na: štěpící laktózu a neštěpící laktózu. (viz. Obr. 5 – přílohy).

Bakterie rodu *Pseudomonas* rostou na ENDO agaru ve světlých průhledných koloniích – neštěpí laktózu.

Díky neschopnosti štěpit i další cukry se řadí bakterie rodu *Pseudomonas* mezi tzv. Gram negativní nefermentující tyčinky. ⁽⁵¹⁾

5. 3 Selektivní agary k záchytu pseudomonád

Jedná se o agary pro izolaci PSAE z klinických nebo potravinářských vzorků. Tyto agary podporují produkci pigmentu pyocyaninu. Díky přítomnosti síranu draselného dochází k potlačení produkce fluoresceinu. ⁽⁵¹⁾

5. 3. 1 Pseudomonádový izolační agar

Selektivita tohoto agaru je založena na přítomnosti irgasanu a halogenované bifenolované sloučenině. Tyto sloučeniny v určité koncentraci brání růstu ostatních bakterií. Na agaru rostou pouze bakterie PSAE. ⁽⁵¹⁾

5. 3. 2 Cetrimidový agar

Již z názvu vyplývá, že tento agar obsahuje vyšší koncentraci cetrimidu (0,3 mg/ml). Kromě *Pseudomonas aeruginosa*, jejíž kolonie jsou obklopeny modrozeleným pyocyaninem, se mohou na agaru objevit rezistentní kmeny klebsiel, proteů a providencií. ⁽⁵¹⁾

5. 3. 3 Pseudomonádový agar C-N

Je vysoce selektivním médiem pro PSAE. Selektivita je dána nižší koncentrací cetrimidu, než u cetrimidového agaru. Dojde tedy ke zlepšení záchytu právě *Pseudomonas aeruginosa*. K potlačení růstu ostatních Gram negativních nefermentujících tyčinek se do média přidává nalidixát sodný. ^(50, 51)

6. IDENTIFIKACE BAKTERIÍ RODU PSEUDOMONAS

Jedním z prvních kroků identifikace je růst na kultivačních médiích, jak základních tak selektivních a selektivně diagnostických. O růstu na kultivačních agarrech jsem se zmínil v předchozí kapitole.

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou ovšem málo kdy odlišitelné od ostatních Gram negativních nefermentujících tyčinek. Proto k jejich identifikaci nestačí pouze kultivace, ale i další identifikační postupy.

6.1 Biochemická detekce cytochromoxidázy

Některé pseudomonády jsou k nerozeznání od acinetobakterů, burkholderií nebo stentofomonád, pak přichází na řadu izolací a oxidázový test.

6.1.1 Princip testu Mikro-La-Test OXItest

Oxidázový test je specifický pro detekci cytochromoxidázy, což je enzym produkovaný některými bakteriálními rody včetně rodu *Pseudomonas*. Přítomnost cytochromoxidázy je detekována barevnou reakcí N, N-dimethyl-1, 4-fenylendiaminu s α -naftolem. Výsledkem reakce je vznik indofenolové modři. ⁽⁵⁴⁾

6.1.2 Jednoduchý procesní přehled Mikro-La-Test OXItest

Sterilní bakteriologickou kličkou se odebere z kultivačního média čistá kolonie. A ta se rozetře na reakční plochu diagnostického proužku testu Mikro-La-Test OXItest. Po uběhnutí inkubační doby (0,5 – 1 minuta) se odečítá vzniklé barevné zabarvení (indofenolová modř).

Nebo lze otisknout přímo reakční plošku na čistou kolonii přímo v misce s kultivačním médiem.

Uvedl jsem procesní přehled zjednodušeně. Detailní provedení testu je dostupné u každé zakoupené soupravy a na stránkách firmy Erbalachema v sekci: Produktová podpora – pracovní návody – mikrobiologie. ⁽⁵⁴⁾

Tabulka 1: Hodnocení testu na detekci cytochromoxidázy od firmy Erbalachema; Mikro-La-Test OXItest; kontrolní kmen *Pseudomonas aeruginosa*, 24 hod, 37°C

		Výsledná barevná reakce	
<i>Test</i>	<i>Zkratka testu</i>	<i>Pozitivní</i>	<i>Negativní</i>
Oxidáza	OXI	modrá, světle modrá	šedá

6. 2 Biochemická identifikace Mikro-La-Test NEFERMtest 24

Testovací set NEFERMtest je produktem firmy Erbalachema. Je určen pro rutinní identifikaci Gram negativních nefermentujících bakterií a čeledí *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae* a bakterií druhu *Plesiomonas shigelloides*. Testovací set je určen především pro bakterie z klinických vzorků. Umožňuje povést identifikaci čtyřiceti kmenů za pomoci dvaceti čtyř biochemických testů. ⁽⁵⁵⁾

6. 2. 1 Složení soupravy Mikro-La-Test NEFERMtest 24

Diagnostická souprava obsahuje:

- 10 mikrotitračních destiček (každá pro identifikaci 4 kmenů) se sušidlem
- Návod na použití s diferenční tabulkou
- Barevná srovnávací stupnice pro tuto soupravu
- 40 formulářů pro záznam výsledků
- 10 PE sáčků pro inkubaci
- Skladovací sáček (na uschování nespotřebované destičky), 1 ks
- Víčko
- CD kódová knihovna

6. 2. 2 Jednoduchý pracovní postup

Uvádím zde zjednodušený pracovní postup. Detailní pracovní postup a další náležitosti je dostupný u každé zakoupené soupravy a na stránkách firmy Erbalachema v sekci: Produktová podpora – pracovní návody – mikrobiologie.

- Izolace kultur

Z primokultivace se provede izolace zvolené bakteriální kultury. Provádí se standardně křížovým roztěrem na zvolené kultivační médium.

- Příprava inokula

Z čistě vyizolované kultury se připraví v nepufrovaném fyziologickém roztoku suspenze o objemu 3 ml. Zákal dobře homogenizované suspenze musí odpovídat 2,0 – 2,5 stupi McFarlandovy zákalové stupnice.

- Inokulace

Z připravené suspenze se pomocí automatické pístové pipety pipetuje 0,1 ml suspenze do všech jamek trojstripu. Trojstrip se uzavře hliníkovou fólií.

- Inkubace

Trojstrip se umístí do PE sáčku a vloží se do termostatu. Inkubace se provádí 24 hodin při 37°C.

- Hodnocení

Pro hodnocení testu se využívá barevná srovnávací stupnice a diferenciacní tabulka, které jsou součástí setu Mikro-La-Test NEFERMtest 24 nebo, jak jsem uvedl úvodem, na webových stránkách společnosti Erbalachema. ⁽⁵⁵⁾

6. 3 Biochemická identifikace krátkou řadou cukrů

Krátká řada cukrů, označována v některých laboratořích jako HISU je jednou z jednodušších způsobů biochemické identifikace bakterií. Využívá se k identifikaci některých bakterií čeledě *Enterobacteriaceae* a příbuzných Gram negativních tyčinek. Tento způsob identifikace zde uvádím proto, že bakterie rodu *Pseudomonas* lze také touto metodou orientačně identifikovat.

Ve své podstatě se jedná o řadu zkumavek, ve kterých se sleduje výsledek jednotlivých biochemických testů. Kombinace těchto testů je charakteristická pro daný rod.

▪ **1. zkumavka – Glukóza**

Zkumavka je naplněná roztokem glukózy a v ní je ještě malá zkumavka, obrácená dnem vzhůru (někdy označována jako tzv.: plynovka). Obsahuje indikátor – bromthymolovou modř.

Hodnocení:

(+)...pozitivní reakce – zkvašení glukózy (zežloutnutí obsahu zkumavky – změna pH) a tvorba plynu (bublinka v plynovce).

(+/-)...pozitivní reakce – zkvašení glukózy, ale bez tvorby plynu

(-)...negativní reakce – nedochází ke zkvašení glukózy (obsah zkumavky zůstává v barvě indikátoru, tedy modrozelený) ani k tvorbě plynu

▪ **2. Zkumavka – Hajnyho agar**

Zkumavka je naplněna Hajnyho agarem a indikátorem je zde citrát železitoamonný. V této zkumavce se zjišťuje tvorba sirovodíku (H₂S). Původní barva agaru je červená.

Hodnocení:

(+)...pozitivní reakce – zčernání agaru v různém rozsahu

(-)... negativní reakce – červené nebo žluté zabarvení

▪ **3. Zkumavka – Urea**

Jedná se o agar, který obsahuje močovinu (ureu) a sleduje se zde její enzymatické štěpení. Enzym štěpící močovinu se nazývá ureáza. Původní barva agaru je zelená.

Hodnocení:

(+)...pozitivní reakce – zmodránění agaru (štěpení urey)

(-)...negativní reakce – zelená, žlutá barva agaru

▪ **4. Zkumavka – Simmons citrát**

Agar obsahuje citrát sodný a sleduje se zde jeho využití jako jediného zdroje uhlíku. Původní barva agarů je také zelená.

Hodnocení:

(+)...pozitivní reakce – zmodráání agarů

(-)...negativní reakce – zelená, žlutá barva agarů

▪ **5. Zkumavka – Hottingerův bujon**

Hottingerův bujon je tekuté, bezbarvé médium sloužící k záchytu tvorby indolu.

Přítomnost indolu se detekuje pomocí Kovacsova činidla. Činidlo se přikapává do zkumavky po proběhlé kultivaci.

Hodnocení:

(+)...pozitivní reakce – červený prstenec na hladině

(-)... negativní reakce – žlutý prstenec na hladině

Tabulka 2: Výsledek testu pro *Pseudomonas aeruginosa* izolována z BAL; 24 hod, 35°C

Po inokulaci médií ve zkumavkách; 24 hod, 35°C

Čísla zkumavek odpovídají číslování v popisu testu a použité symboly také.

Číslo zkumavky	1.	2.	3.	4.	5.
Výsledek testu	-	-	-	+	-

Krátká řada cukrů z důvodu nejasné identifikace se rozšiřuje o různé mikrometody (již zmíněný Mikro-La-Test NEFERMtest 24). Mikrometody pracují s malým objemem a obsahují více testů. ⁽⁵¹⁾

6. 4 Biochemická identifikace pomocí VITEK systému

System VITEK vznikl v roce 1970 jako automatizovaný systém pro identifikaci s určením citlivosti bakterií k antibiotikům. Postupem času se vyvinul do systému VITEK 2 (bioMérieux).

6. 4. 1 VITEK 2 systém

Jedná se o integrovaný modulární systém složený z: plnicí jednotky, čtečky karet, řídicího PC modulu, datového terminálu a tiskárny. Optický systém detekuje bakteriální růst a metabolické změny v jamkách tenkých plastových karet. Jamky v kartách obsahují buď různá antibiotika (karty pro stanovení citlivosti k antibiotikům) nebo biochemické substráty (karty pro identifikaci).

Detekce je založena na měření ve vícekanálovém fluorimetru a fotometru. Měření se získávají hodnoty fluorescence, zákalu a kolorimetrické signály. ^(15, 30)

6. 4. 2 Hrubý procesní přehled

Identifikační karty spolu s připravenou bakteriální suspenzí se vkládají do plastových stojánek. Ty jsou vloženy do inkubační – čtecí části. Inkubační teplota je cca 35,5 °C. Karty jsou automaticky naplněné suspenzí díky vakuovému zařízení. Karty jsou zapečetěné a podstupují kinetickému měření fluorescence každých 15 minut. Výsledky jsou interpretovány databází ID – 6 PC po inkubační periodě 4 hodiny. Konečné výsledky jsou získány automaticky, minimálně po 4 a maximálně po 15 hodinách inkubace. Všechny použité karty jsou automaticky vyřazené do odpadkového kontejneru. ⁽¹⁵⁾

6. 5 MALDI-TOF MS

Od svého uvedení na trh MATRIX-ASSISTED-DESORPTION-IONIZATION = MALDI ve spojení s analyzátozem doby letu (time-of-flight = TOF) nachází uplatnění v mnoha oblastech.

Jednou z nich je právě i mikrobiální diagnostika, identifikace a diferenciacie bakteriálních izolátů. ^(2, 53)

6. 5. 1 Princip a charakteristika metody

Jedná se o analytickou techniku založenou na zjištění relativní molekulové hmotnosti. MALDI je měkká ionizační technika. Umožňuje desorpci peptidů a proteinů z celých kultivovaných mikroorganismů.

Technika spočívá v ionizaci vzorku krátkými pulsy laserového záření (obvykle dusíkový laser s pracovní vlnovou délkou $\lambda = 337 \text{ nm}$).^(8, 53)

6. 5. 2 Jednoduchý procesní přehled

Vzhledem k tomu, že MALDI – TOF hmotnostní spektrometrie je velice citlivá technika, postačuje pro vlastní analýzu malé množství mikrobiální masy (10^4 – 10^6 CFU).

Mikrobiální masa se rozpustí nebo resuspenduje v nadbytku matrice v poměru koncentrací $1:10^4$. Některé studie uvádí, že postačí 1 μl roztoku matrice. Jako matrice se používají deriváty kyseliny benzoové a kyseliny skořicové (např.: α -kyano-4-hydroxyskořicová, sinapinová a další).

Získaná směs se nanáší na ocelovou destičku a po vysušení se umístí do hlubokého vakua (10^{-4} Pa).

Matrice absorbuje energii krátkého laserového pulsu. Energie je velmi šetrně předána molekulám vzorku. Molekuly vzorku se uvolňují ve formě molekulových iontů $[M + H]^+$.

Takto vzniklé ionty se dostávají díky extrakčním mřížkám, na které je vloženo vysoké napětí, do analyzátoru.^(2, 8, 11)

6. 5. 3 Analyzátor TOF

MALDI společně s analyzátozem doby letu TOF je velmi citlivou metodou pro detekci molekul o vyšší molekulové hmotnosti.

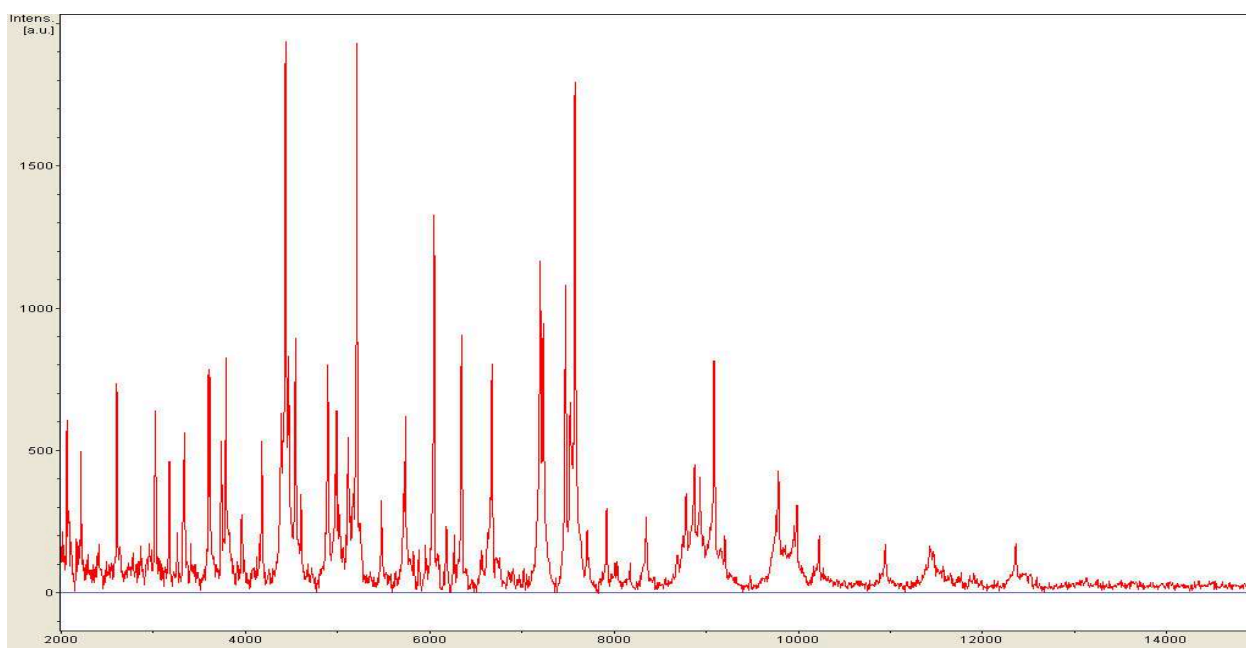
Ionty s rozdílným poměrem m/z (hmotnosti k náboji) mající stejnou energii, se budou pohybovat stejnou rychlostí. Což je princip analyzátoru doby letu.

Energie se iontům dodává pomocí soustavy extrakčních mřížek, na které je obvykle vloženo napětí 10 – 20 kV.

Pro daný bakteriální kmen tento postup během několika minut poskytne spektrum. Získané spektrum se skládá z řady píků, které odpovídají poměru m/z jednotlivých iontů. (8, 11)

6. 5. 4 Hodnocení identifikace pomocí MALDI – TOF MS

Získané spektrum se porovná s knihovnou spekter a dojde k identifikaci.



Obrázek 1: Spektrum *Pseudomonas aeruginosa* izolované z BAL; 18 hod, 35°C

6. 5. 5 Shrnutí identifikace bakteriálních izolátů pomocí techniky

MALDI – TOF

Pro jednoduchost jsem zvolil tabulkové uspořádání.

Tabulka 3: SOP Identifikace bakteriálních izolátů ⁽⁴⁶⁾

ČISTÁ KULTURA	Získána izolací jedné kolonie z primokultivace.
MIKROSKOPIE	Preparát obarvený dle Grama.
MALDI – TOF	
IDENTIFIKOVÁNO	
VALIDACE IDENTIFIKACE	
INTERPRETACE	
VALIDACE KLINICKÁ	
CITLIVOST ATB	
VÝSLEDEK	

6. 6 Molekulární techniky

Metody na bázi identifikace genotypu obcházejí problém proměnlivého fenotypu. Poskytují přesnější identifikaci bakteriálních druhů. Nicméně taxonomické složitosti, nejistá fylogeneze a nedostatek sekvenčních genomových dat v rámci širokého rodu *Pseudomonas*, představují překážku pro genotypové identifikační testy. ⁽⁴⁸⁾

6. 6. 1 PCR – polymerázová řetězová reakce

Jedná se o amplifikační metodu, která umožňuje namnožení specifického úseku templátové DNA. Jedná se o techniku probíhající *in vitro*. ⁽¹⁾

6. 6. 2 Jednoduchý procesní přehled klasické PCR

Amplifikace cílové DNA se provádí v reakčním objemu (většinou 25 µl) celá reakční směs se označuje jako „master-mix“.

Složení master-mixu:

- $MgCl_2$ (Mg^{2+})
- Pufr
- Deoxynukleotidtrifosfáty (DTP)
- Specifické primery
- Taq polymeráza (termostabilní)
- Genomová DNA
- Redestilovaná voda
- Bakteriální lyzát

Takto připravený master-mix v mikrozkušnici, umístíme do termocykleru kde probíhá střídání teplotních cyklů a probíhá vlastní PCR reakce.

Teplotní fáze PCR reakce

- Denaturace templátové DNA (95°C)
- Annealing – navázání primerů (50°C)
- Polymerace (72°C)

Cykly se mnohokrát opakují, dokud nedojde k požadovanému namnožení produktu. ^(1, 48)

6. 6. 3 Real Time – PCR

Je revoluční metoda využívaná v mikrobiologii pro diagnostiku lidských patogenů. Tato metoda kombinuje PCR s fluorescenční detekcí sondy amplifikovaného produktu ve stejné reakční nádobě. Obecně platí, že PCR a detekce amplifikovaného produktu jsou dokončeny asi za hodinu, což je podstatně rychlejší než klasická PCR a detekce. ⁽¹³⁾

6. 6. 4 PCR u pseudomonád

Tato PCR je založena na specifických primerech, které se podílejí na selektivní amplifikaci 990 bp fragmentu 16S rDNA pseudomonád.

16S rDNA se používá jako „zlatý standard“ v určování taxonomie a fylogeneze bakteriálního druhu. Selektivní amplifikace 16s rDNA rodu *Pseudomonas* pomocí PCR je následována analýzou délky restrikčních fragmentů nebo gradientovou gelovou elektroforézou. ^(8, 41)

7. REZISTENCE A JEJÍ HLAVNÍ MECHANISMY

Pseudomonas aeruginosa je rezistentní k různým antibiotikům. Nízká permeabilita její vnější membrány, konstitutivní exprese různých efluxních pump, produkce enzymů inaktivujících antibiotika (indukovatelné cefalosporinázy) – to jsou jedny z důležitých mechanismů, které dělají z kosmopolitně rozšířené bakterie velice obávaného patogena. Dále má kapacitu rozvinout nebo získat nové mechanismy rezistence proti antibiotikům. Obecná rezistence vzniká díky kombinaci několika faktorů:

- PSAE je rezistentní k antibiotikům v důsledku nízké propustnosti její buněčné membrány.
- PSAE má genetickou schopnost vyjadřovat široký repertoár mechanismů rezistence.
- Může se stát rezistentní díky mutacím chromozomálních genů, které regulují geny rezistence.
- Může získat geny rezistence z jiných organismů, přes plazmidy nebo transpozómy a bakteriofágy. ^(11, 24)

7. 1 Nепropustnost vnější membrány

K tomu aby antibiotika mohla vyvíjet své účinky na pseudomonády, musí pronikat k jejich intracelulárním strukturám. U pseudomonád to vyžaduje podstatnou propustnost vnější membrány.

Vnější membrána tvoří semipermeabilní bariéru na vychytávání antibiotik a molekul substrátů. Protože vychytávání malých hydrofilních molekul jako jsou β -laktamy, je omezená jen na malou plochu vnější membrány (přesněji na vodné kanály porinových proteinů). Vnější membrána limituje pohyb těchto molekul do buňky.

7. 1. 1 Průnik antibiotik přes buněčnou membránu *Pseudomonas aeruginosa*

Všechny hlavní třídy antibiotik používaných k léčbě infekcí vyvolaných PSAE, musí proniknout přes buněčnou membránu ke svému cíli.

Tabulka 4: Místa působení antibiotik u infekcí způsobených *Pseudomonas aeruginosa*

Skupina antibiotik	Antibiotikum	Působení antibiotika
AMINOGLYKOSIDY	<i>Gentamicin</i> <i>Tobramycin</i> <i>Amikacin</i>	Inhibují syntézu proteinů vazbou na podjednotku 30S ribozómu.
CHINOLONY	<i>Ciprofloxacin</i>	Váží se na podjednotku DNA – gyrázy, která udržuje strukturu chromozómu uvnitř buněk.
β – LAKTAMY	<i>Piperacilin</i> <i>Ceftazidim</i> <i>Imipenem</i> <i>Meropenem</i> <i>Aztreonam</i>	Inhibují ukotvení transpeptidáz peptidoglykanu na vnější povrch cytoplazmatické membrány.
POLYMYXINY	<i>Colistin</i>	Váží se na fosfolipidy cytoplazmatické membrány a ničí její ochrannou funkci.

7. 1. 2 Vnější membrána jako bariéra

Vnější membrána *Pseudomonas aeruginosa* představuje významnou překážku k pronikání antibiotik. Omezuje rychlost pronikání malých hydrofilních molekul, kromě větších molekul. Malá hydrofilní antibiotika, jako β-laktamy a chinolony mohou procházet pouze vnější membránou při průchodu vodnými kanály podle porinů.

PSAE produkuje několik různých porinů (Opr). OprF reprezentuje neefektivní cestu uptake. OprD je specializovaný porin, který má specifické role v příjmu kladně nabitých aminokyselin jako je lysin. Ztráta OprD je často spojovaná s rezistencí k imipenemu. Je zajímavé, že meropenem není ovlivněn ztrátou OprD. To naznačuje, že karbapenemy přeskočily vnější membránu prostřednictvím různých kanálů. Rezistence k aminoglykosidům a kolistinu byly pozorovány u PSAE v důsledku zvýšené exprese

vnějšího membránového proteinu OprH, který chrání lipopolysacharid od vazby na antibiotikum.

Vnější membrána jako mechanismus rezistence je významná v souvislosti s dalšími mechanismy rezistence. ^(17, 24, 40)

7.2 Role efluxního systému

Efluxní (výtokové) systémy vyjadřují širokou substrátovou specifitu. Jejich exprese u Gram negativních bakterií je spojena s rezistencí na více klinicky příslušných antimikrobiálních látek. Efluxní systémy pro vícero léčiv se skládají ze tří proteinových komponent.:

- Pumpa závislá na energii, přítomná na cytoplazmatické membráně
- Poriny vnější membrány
- Spojovací protein, který spojuje dvě komponenty membrány dohromady

Toto tříčlankové uspořádání dává vzniknout efektivnímu vylučovacímu systému pro toxické molekuly, přítomné v cytoplazmě, cytoplazmatické membráně nebo periplazmě (oblast mezi vnější a cytoplazmatickou membránou).

U PSAE byly popsány čtyři různé efluxní systémy pro antibiotika:

- Mex AB – oprM, zodpovědný za vylučování β -laktamů, chinolonů a desinfekčních prostředků
- Mex XY – oprM, podílí se na vylučování aminoglykosidů
- Mex DC – oprJ
- Mex EF – oprN 10, vylučují karbapenemy a chinolony

Efluxní systém zahrnující tyto proteiny je zásadní pro vlastní rezistenci *Pseudomonas aeruginosa*. Delece v kterémkoli z genů kódující tyto proteiny vede k čtyř až deseti násobnému nárůstu citlivosti na chinolony, β -laktamy (kromě imipenemu), tetracykliny a chloramfenikol.

Geny efluxních systémů jsou přítomny ve všech kmenech, ale nejsou exprimovány ve vysokých hladinách. Zvýšená exprese může být způsobena mutací v regulačních genech, jako jsou např.: Mex R, který kóduje expresi Mex AB – oprM genů.

Expozice jednomu antibiotiku může selektovat mutanty PSAE se zvýšenou produkcí pump. Ty mají křížovou rezistenci vůči všem antibiotikům, které jsou substráty potlačených pump. Chinolony, které jsou substráty všech Mex efluxních pump, jsou

náchylné k výběru na křížovou rezistenci proti aminoglykosidům nebo β -laktamům. ^(11, 24, 40)

Eflux obvykle uděluje nízký až středně těžký stupeň rezistence. A hraje významnou roli u klinických izolátů, nejméně ze tří důvodů:

1. Výrazně snižuje výběr účinných antibiotik (např.: nadexprese Mex XY – oprM u klinických izolátů uděluje rezistenci nejenom k aminoglykosidům, ale i cefepimu a fluorochinolonům).
2. Spolupracuje s jinými mechanismy (např.: mutace v cílových strukturách chinolonů nebo produkce β -laktamázy) zvyšuje úroveň rezistence.
3. Dává vzniknout mutacím, které snižují koncentraci antibiotika uvnitř bakterie. ^(11, 17)

7.3 Produkce enzymů

Převládající mechanismus rezistence k β -laktamovým antibiotikům zůstává u produkce β -laktamázy enzymů, které inaktivují antibiotikum hydrolýzou amidové vazby β -laktamového kruhu molekuly. Rozeznáváme čtyři molekulární třídy β -laktamázy: třída A penicilinázy, třída B metalo- β -laktamázy, třída C cefalosporinázy a třída D oxacilinázy. Rezistence vzniká přirozenou nebo mutační derepresí chromozomálních genů nebo získáním extrachromozomálních genetických elementů (plazmidy a transpozomy) nesoucí geny rezistence. ⁽⁴⁰⁾

7.4 Alginát, biofilm a rezistence

Charakteristickým rysem mnoha kmenů *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s cystickou fibrózou, je produkce polysacharidu – alginátu. Ten se podílí na tvorbě biofilmů a snížení citlivosti k antibiotikům. Charakteristickým rysem biofilmů je jejich pozoruhodná odolnost k vymícení fyzikálními a chemickými vlivy včetně antibiotik. ^(24, 48)

7.5 Změny v cíli

Záměny lékových cílů, které interferují nebo omezují vzájemné působení antibiotik, zabraňují bakteriostatickým (bakteriocidním) účinkům těchto látek a tím zvyšují rezistenci. Tento mechanismus rezistence je důsledkem mutačních změn v cílových enzýmech, které nevedou k udržování jejich zásadní role v buněčném metabolismu, ale v rezistenci vůči selektivnímu působení antibiotik.

U *Pseudomonas aeruginosa* se setkáváme s rezistencí k chinolonům. Díky mutaci v genu Gyra, který kóduje podjednotku cílového enzymu DNA – gyrázy. Dojde ke změně ve struktuře podjednotky 30S ribozómu (cíl aminoglykosidů). Změny v penicilin vázajících proteinech (PBP) vedou také k odolnosti proti β -laktamům. ^(24, 40)

8. PRODUKCE KARBAPENEMÁZ A JEJICH DETEKCE

Jedním z mnoha mechanismů, jak se bakterie rodu *Pseudomonas* brání účinné terapii je produkce enzymů. Funkce těchto enzymů je inaktivace antibiotik. Karbapenemázy jsou β -laktamázy s univerzální hydrolytickou kapacitou představují velkou hrozbu klinické prospěšnosti pro všechna β -laktamová antibiotika. ^(3, 9)

8.1 β -laktamová antibiotika

β -laktamová antibiotika mají různé strukturální podtypy. Tato antibiotika mají společnou chemickou strukturu, tzv. β -laktamový kruh.

Strukturální podtypy:

- Penemy (penicilin, ampicilin)
- Cefemy (cefalosporiny, cefamyciny)
- Monobaktamy (monocyklické β -laktamy zahrnující aztreonam)
- Karbapenemy

Enzymy, které hydrolyzují amidovou vazbu na čtyřčlenném β -laktamovém kruhu, se nazývají β -laktamázy. Jsou tedy hlavní příčinou odolnosti – rezistence bakterií k β -laktamovým antibiotikům. ^(3, 4)

8.2 Rozdělení β -laktamáz

Získané karbapenemázy představují heterogenní skupinu β -laktamáz, které patří do 3 různých molekulárních skupin.

Tabulka 5: Hlavní skupiny β -laktamáz (rozdělení dle Amblera). ⁽²⁰⁾

Supina	Označení karbapenemáz	Bakteriální druhy u kterých byly nalezeny
A serin-β-laktamázy	KPC, GES, SME, IMI, NMC	<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia marcescens atd.</i>), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
B metalo-β-laktamázy	VIM, IMP, GIM, SIM, NDM, SPM, AIM, KMH, DIM, TMB	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
D serin-β-laktamázy	OXA-48, OXA-162, OXA-181 Skupiny OXA-23, -58, -40	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> ; <i>Acinetobacter baumannii</i>

8. 3 Genetika β -laktamáz

Geny kódující β -laktamázy mohou být umístěny na bakteriálním chromozómu, na plazmidech nebo transpozómech.

B-laktamové geny = BLA geny určují, zda budou β -laktamázy syntetizovány přirozeným nebo získaným způsobem. V poslední době roste počet BLA genů, které se nachází na integronech.

Integrony, jsou geny proměnlivé délky. Na 5' konci obsahují genovou kazetu (zásobník) s ostatními geny antibiotické rezistence. Dále obsahují integrační místo pro genové kazety (ATTI). Integrony nejsou mobilní. Ovšem jejich umístění v mobilních genetických elementech (plazmidy a transpozómy) umožňuje jejich pohyb.

Mobilní genetické prvky, které obsahují integrony jsou důležitým zdrojem pro šíření BLA genů a jiných determinant rezistence. ⁽³⁾

8. 4 Metallo- β -laktamázy

Vznik získaných metallo- β -laktamáz (MBL) u hlavních Gram negativních podmíněných patogenů (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*) má závažné klinické a epidemiologické důsledky. Jsou tedy předmětem zájmu po celém světě. MBL mohou degradovat všechna β -laktamová antibiotika, s výjimkou monobaktamů.

Mezi klinicky důležité metallo- β -laktamázy patří skupiny IMP a VIM. Tyto skupiny způsobují rezistenci na všechna β -laktamová antibiotika, kromě monobaktamů.

Další klinicky významné metallo- β -laktamázy jsou uvedeny v tabulce číslo 5. ^(3,9)

8. 5 Inhibitory β -laktamáz

Doposud všechny známé inhibitory nebo inaktivátory serin- β -laktamáz nejsou účinné na metallo- β -laktamázy.

Šíření metallo- β -laktamáz u nozokomiálních bakteriálních patogenů, odůvodňuje vyhledávání sloučenin, které mohou snížit aktivitu těchto enzymů.

Bohužel objev klinicky užitečného a specifického inhibitoru MBL je ztížen tím, že tato sloučenina musí zůstat aktivní na lidských proteinech, které jsou členy nadrodiny MBL. Nebo na jiných metallo-enzymech (např.: angiotensin konvertující enzym). Dalším problémem je nalézt sloučeniny aktivní pro všechny podskupiny MBL. ⁽⁴⁾

8. 6 Detekce karbapenemáz

Detekce producentů karbapenemáz z klinických izolátů je především založena na výsledcích citlivosti k antibiotikům. Buď diskovou difúzní metodou, nebo automatizovanými systémy. Určení těchto producentů je jedním z hlavních způsobů pro výběr vhodného terapeutika. Detekce karbapenemázové aktivity v klinickém izolátu může být pro laboratoř náročná. První důvod k podezření, že se na infekci podílejí karbapenemázy, je zvýšená hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro karbapenemová antibiotika. ^(9, 35, 36)

8. 6. 1 Referenční metoda

Spektrofotometrické měření koncentrace EDTA, která inhibuje karbapenemovou hydrolýzu se provádí s hrubým buněčným extraktem, je referenční metodou pro potvrzení produkce MBL. Tato metoda není vhodná k použití v rutinních laboratořích. Jednodušší fenotypové testy, založené na difúzních nebo dilučních metodách jsou v rutinních laboratořích brány jako specifické. ⁽⁹⁾

8. 6. 2 Molekulární techniky

Molekulární metody (PCR nebo DNA hybridizace) potvrzují přítomnost MBL genu v klinických izolátech a mohou být přijaty jako součást screeningu. Tyto metody jsou omezeny pouze na referenční nebo výzkumné laboratoře. Pro menší laboratoře je jejich náročnost nepřijatelná. Kromě toho molekulární metody detekují pouze MLB geny, které jsou v uznávané nabídce dostupných sond. Mohou tedy minout detekci nově vzniklých genů. ⁽⁹⁾

8. 6. 3 Fenotypové testy

Řada jednoduchých fenotypových testů pracuje na principu diluce nebo diskové difúze. Využívají některých látek (EDTA, kyselina fenylboritá) inhibovat karbapenemázy. Nejsou ovšem tolik specifické. Některé karbapenemázy OXA-typu nelze takto detekovat. ^(20, 35)

8. 6. 3. 1 Hodge test

Metoda jetelového listu (modifikovaný Hodge test (MHT)) byla používána jako hlavní fenotypová metoda pro detekci karbapenemázové aktivity. Metoda je založena na inaktivaci karbapenemu buď celými buňkami, nebo buněčnými extrakty

organismů produkujících karbapenemázy. Umožňuje karbapenem citlivému druhu rozšířit růst směrem ke karbapenemovému indikátorovému disku. V Evropě tento test není uznáván jako hlavní diagnostická metoda. ^(9, 20, 35)

8. 6. 3. 2 CARBA NP test

Tento test rozlišuje izoláty pseudomonád na karbapenemázy produkující a karbapenemázy neprodukující. Je založen na biochemické detekci hydrolýzy karbapenemu a imipenemu, což má za následek změnu barvy indikátoru pH. Test eliminuje potřebu detekce pomocí Hodge testu, fenotypových testů pro inhibici β -laktamáz. Test je vysoce specifický, citlivý a rychlý (méně než 2 hodiny). ⁽¹²⁾

8. 6. 4 Detekce pomocí MALDI – TOF

Pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF je možno detekovat molekuly karbapenemu a jeho dalších variant (produkty odbourávání, sodná sůl atd.). Na rozdíl od molekulárních technik nám tato metoda podává reálné informace o produkci karbapenemáz.

8. 6. 4. 1 Detekce degradačních produktů meropenemu

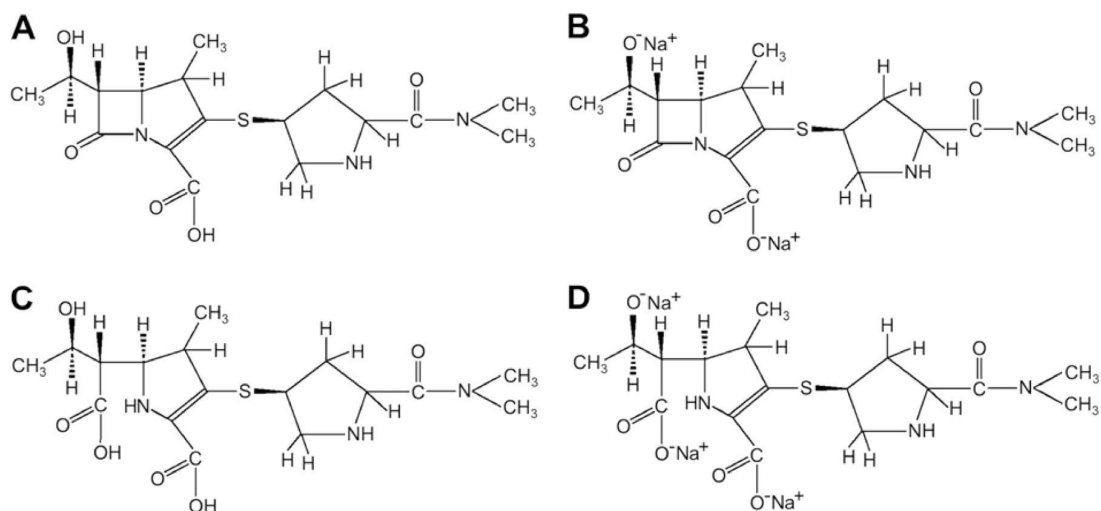
B-laktamázy degradují meropenem ve dvou fázích:

1. hydrolýza amidové vazby v β -laktamovém kruhu
2. dekarboxylace molekuly

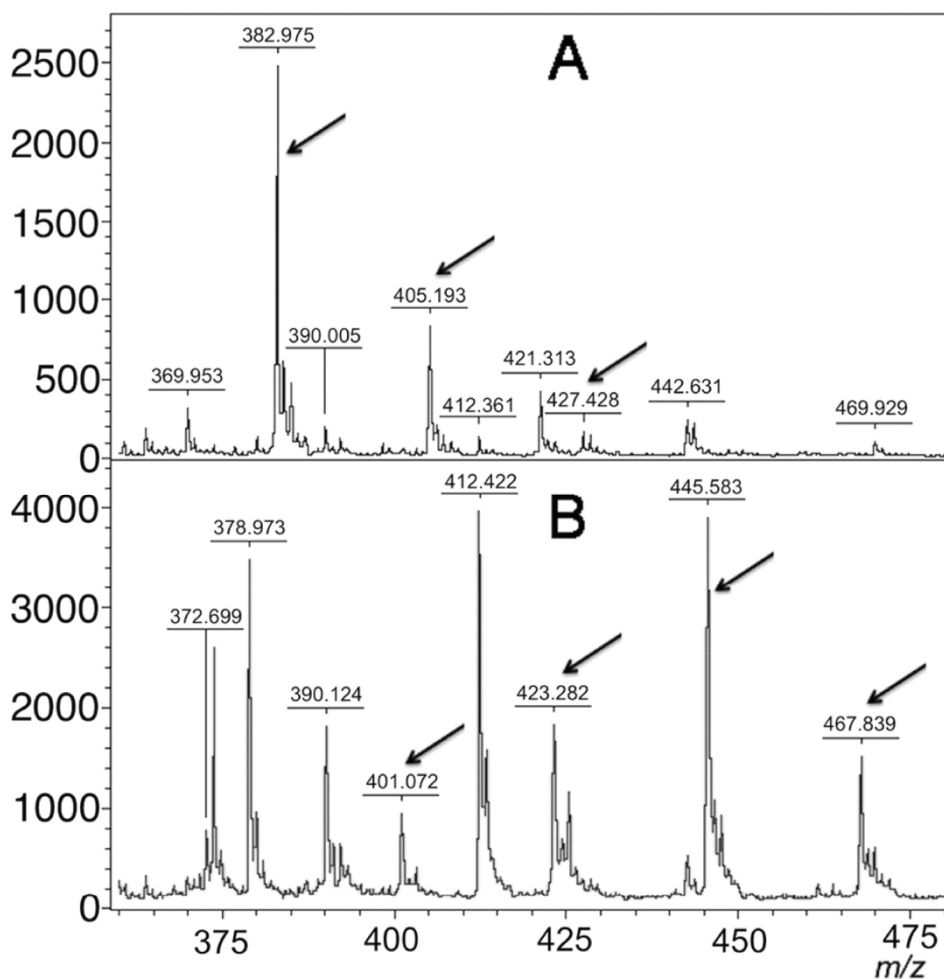
Vznikají tedy degradační produkty o různých molekulových hmotnostech, které jsou detekovány pomocí této metody. ⁽²⁰⁾

Tabulka 6: Degradační produkty meropenemu a jeho molekulové hmotnosti ⁽²⁰⁾

Molekula	poměr hmotnost/náboj
Meropenem MW	383,5
[Meropenem+H] ⁺	384,5
[Meropenem+Na] ⁺	406,5
[Meropenem+2Na] ⁺	428,5



Obrázek 2: Chemické struktury meropenemu: 383,464 Da (A), jeho disodná sůl, 427,422 Da (B), produkt rozkladu meropenemum s narušenou amidovou vazbou, 401,483 Da (C), a jeho trisodná sůl, 467,420 Da (D)



Obrázek 3: Hmotnostní spektra meropenemu (nalezená hmotnost 382,975 m / z) a jeho sodné soli (405,193 m / z a 427,428 m / z) (A) a meropenem s narušenou amidovou vazbou (401,072 m / z) a jeho sodná sůl (423,282 m / z, 445,583 m / z, a 467,839 m / z) (B). Píky testovaných molekul jsou označeny šipkami. Jednotky na ose y představuje relativní intenzitu.

8. 6. 4. 2 Analýza spekter z MALDI – TOF

Zjištěné vrcholy jsou porovnávány s molekulovými hmotnostmi meropenemu a jeho degradačními produkty. ⁽¹⁹⁾

9. PSEUDOMONÁDOVÉ INFEKCE A JEJICH LÉČBA

Pseudomonády jsou všude přítomné v přírodě, jsou izolovány z vody, půdy, odpadního vod, rostlin, zvířat a člověka. *Pseudomonas aeruginosa* se stala významnou příčinou infekce, u pacientů se sníženou funkcí obranných mechanismů nebo se specializovanou povahou základního onemocnění (např.: cystická fibróza). Je nejčastějším patogenem izolovaným od pacientů, kteří byli hospitalizováni déle než jeden týden. Je důležitým nozokomiálním patogenem. Výrazně přispívá k výskytu močových cest u pacientů s permanentním močovým katétrem (PMK). Pseudomonádové infekce jsou složité a mohou být život ohrožující. Velkým rizikem je infekce vyvolaná rezistentní pseudomonádou. ^(16, 28, 29)

9.1 Nejčastěji zasažená místa

Pseudomonádové infekce mohou zahrnovat následující části těla s odpovídajícími příznaky a projevy.

- Dýchací cesty (zápaly plic)
- Krevní oběh (bakteriémie)
- Srdce (endokarditida)
- Centrální nervový systém (meningitida, mozkový absces)
- Uši (zánět středního a zevního ucha)
- Oči (bakteriální keratitida)
- Klouby a kosti (osteomyelitida)
- Gastrointestinální trakt (průjem, enteritida, enterokolitida)
- Močové cesty
- Kůže

Infekce vyvolané rezistentními pseudomonádami, jsou velice problematické, protože jsou asociované s třikrát vyšší mortalitou, devětkrát vyšší mírou sekundární bakteriémie a výrazně delší dobou hospitalizace. ^(28, 29)

9. 2 Nozokomiální nákazy

Nozokomiální nákazy neboli nemocniční infekce postihují osoby v souvislosti s hospitalizací ve zdravotnických zařízeních. Postihují především pacienty, ale také i personál a návštěvy nemocných.

Riziko vzniku nozokomiální infekce přímo souvisí s invazí zdravotnických prostředků nebo chirurgickými zákroky. Rizikovou skupinou pacientů jsou pacienti, kteří jsou již oslabeni (hematoonkologičtí pacienti, pacienti s popáleninami). Nejčastější jsou ventilátorové pneumonie a infekce močových cest. ^(38, 39)

9. 2. 1 Pneumonie

Nozokomiální pneumonie jsou nejčastější infekce ohrožující život pacienta. Ve většině případů jsou spojeny s mechanickou ventilací. Vyskytují se u 10 – 20 % pacientů napojených na ventilátory delší dobu než 48 hodin. Jsou spojeny s prodloužením délky hospitalizace a úmrtností. Kromě *Pseudomonas aeruginosa* se na nich podílí i *Acinetobacter baumannii* a různí zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. ^(43, 44)

9. 2. 2 Infekce močových cest

Téměř všechny gram negativní organismy včetně PSAE způsobují infekce močových cest. Tyto infekce jsou spojeny často se zavedením močového katétru. Po druhém dni katetrizace se odhaduje, že počet bakterií se zvyšuje o 5 – 10 % za den. Většina případů je asymptomatická bakteriurie. Účinným řešením je odstranění katétru, než léčba antibiotiky. ⁽³⁸⁾

9. 2. 3 Infekce krevního oběhu

Tyto infekce jsou život ohrožující událost a nejčastěji jsou spojovány s přítomností centrálního žilního katétru. Mohou být také spojeny s Gram negativní infekcí v jiných částech těla, jako jsou plíce, močové cesty a gastrointestinální trakt. ⁽³⁸⁾

9. 3 Terapie infekcí vyvolaných pseudomonádami

Základem antimikrobiální léčby může být kombinace dvou antibiotik (např.: antipseudomonádové β -laktamy a aminoglykosidy). Empirická terapie musí být komplexní a měla by zahrnovat všechny pravděpodobné patogeny v souvislosti s klinickým prostředím.

Gentamicin

Jedná se o aminoglykosid a má široké gram negativní pokrytí.

Tikarcilin

Inhibuje biosyntézu buněčné stěny a je účinný v aktivní fázi růstu. Jedná se o antipseudomonádový penicilin s inhibitorem β -laktamáz.

Piperacilin

Antipseudomonádový penicilin s inhibitorem β -laktamáz. Inhibuje biosyntézu buněčné stěny a je účinný v průběhu aktivního množení.

Imipenem

Je širokospektrým β -laktamovým antibiotikem.

Aztreonam

Monobaktam, který inhibuje biosyntézu buněčné stěny v průběhu růstu. Je aktivní proti gram negativním patogenům. Je nevhodný pro anaeroby a gram pozitivní patogeny. Používá se u pacientů alergických na peniciliny a cefalosporiny.

Ciprofloxacin

Má fluorochinolonové účinky proti pseudomonádám. Inhibuje syntézu bakteriální DNA.

Cefepim

Slouží pro léčbu pseudomonádových infekcí a patří do čtvrté generace cefalosporinů. Je nejlepším β -laktamem pro intra muskulární podání. Ovšem špatně překračuje hematoencefalickou bariéru.

Ceftazidim

Patří do třetí generace cefalosporinů s vysokou aktivitou proti rodu *Pseudomonas*. Znemožňuje růst bakteriím vazbou na jeden nebo více penicilin vazebných proteinů (PBP).

Tobramycin

Získává se ze *Streptomyces tenebrarius*. Je dvakrát až čtyřikrát silnějším antipseudomonádovým antibiotikem ve srovnání s gentamicinem.

Meropenem

Polosyntetické antibiotikum, které inhibuje syntézu buněčné stěny. ⁽²⁸⁾

10. DISKUZE

V několika posledních letech představují bakterie rodu *Pseudomonas* jedny z nejobávanějších patogenů. Díky neustálému rozvoji rezistence, včetně vzniku nových mechanismů rezistence a složitosti multirezistentních fenotypů nutí k vývoji vhodných diagnostických nástrojů.

Podle mého názoru je jedním z těchto nástrojů, právě technika MALDI – TOF MS, která slouží k diagnostice bakteriálních kmenů a detekci jednoho z mechanismů rezistence – produkce karbapenemáz. Dalšími diagnostickými nástroji jsou i molekulární techniky, ovšem jejich aplikace je značně omezená. Myslím si, že díky jejich rychlému rozvoji, by se mohly v následujících letech rozšířit i na menší pracoviště. Problém k aplikaci těchto metod bude kromě financí i personální zajištění.

Jedním z cílů práce bylo právě objasnění techniky MALDI – TOF MS, která je rozšířena na mnoha mikrobiologických pracovištích. Mechanismy vzniku rezistence u pseudomonád byly do jisté míry popsány také, zvláště produkce karbapenemáz, která je dle mého názoru jednou z těch důležitějších.

Pro kontrolu infekcí mikrobiologové a kliničtí lékaři realizují preventivní opatření, která jsou zaměřena na snížení nozokomiálních nákaz. Prioritou léčby infekcí vyvolaných pseudomonádami by měli být farmakologické a mikrobiologické údaje. Infekce vyvolané pseudomonádami by měly být včas diagnostikovány – dbát na kvalitu mikrobiologického vyšetření.

Důležitým postupem je také dodržení správnosti odběru (lokalizace, včasný transport do laboratoře).

U pacientů, kteří jsou oslabeni (hematoonkologičtí pacienti, pacientti hospitalizováni na ARO a JIP) je velmi důležité pravidelné provádění screeningu.

11. ZÁVĚR

Tato rešerše informuje o vzniku rezistence bakterií rodu *Pseudomonas* a o možnostech její detekce.

Obecné vlastnosti rodu *Pseudomonas* popisují morfologii, metabolickou aktivitu a některé vlastnosti, které přispívají k patogenitě pseudomonád – tvorby biofilmu, produkce extracelulárních látek.

Pro kultivaci pseudomonád se používají základní kultivační agary – krevní agar. Ovšem na ENDO agaru, který je diagnosticky specifický je možné pseudomonády zařadit, jako neštěpící laktózu. Selektivní agary pro kultivaci pseudomonád nejsou v klinické praxi často využívány.

Identifikace rodu *Pseudomonas*, je založena na klasických fenotypových metodách – detekce cytochromoxidázy, sledování zkvašování jednotlivých substrátů (Mikro-La-Test NEFERMtest 24). Novými metodami je především využití techniky MALDI – TOF a VITEK 2 SYSTÉM. Molekulární techniky PCR, především Real Time PCR – umožňující kvantifikaci.

Rezistence bakterií rodu *Pseudomonas* je závislá na mnoha mechanismech, jako je nepropustnost vnější membrány, produkce řady enzymů, tvorba porinů a důležitou roli má i efluxní systém.

Karbapenemázy, které štěpí β -laktamový kruh jsou velice významné a jejich stanovení není radno podceňovat. Detekce jejich tvorby je díky systému MALDI – TOF MS daleko jednodušší, než klasickými fenotypovými metodami. Detekce je založena na měření degradačních produktů meropenemu.

Infekce vyvolané pseudomonádami jsou velice obávané díky své schopnosti rychle vytvářet mechanismy rezistence. Nozokomiální infekce vyvolané pseudomonádami jsou spojeny s prodloužením délky hospitalizace a s vyšší mortalitou.

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Spektrum *Pseudomonas aeruginosa* izolované z BAL; 18 hod, 35°C 28

Obrázek 2: Chemické struktury meropenemu: 383,464 Da (A), jeho disodná sůl, 427,422 Da (B), produkt rozkladu meropenemum s narušenou amidovou vazbou, 401,483 Da (C), a jeho trisodná sůl, 467,420 Da (D) 41

Obrázek 3: Hmotnostní spektra meropenemu (nalezená hmotnost 382,975 m / z) a jeho sodné soli (405,193 m / z a 427,428 m / z) (A) a meropenem s narušenou amidovou vazbou (401,072 m / z) a jeho sodná sůl (423,282 m / z, 445,583 m / z, a 467,839 m / z) (B). Píky testovaných molekul jsou označeny šipkami. Jednotky na ose y představuje relativní intenzitu. 41

Obrázek 4: *Pseudomonas aeruginosa* izolována z BAL, Krevní agar, kultivace: 35°C 48 hodin. Po prodloužené kultivaci je pozorována výrazná zóna β hemolýzy. 59

Obrázek 5: *Pseudomonas aeruginosa* izolována z BAL, ENDO agar, 35°C, 24 hodin. Na agaru pozorujeme světlé kolonie v barvě agaru, nedochází ke štěpení laktózy. 59

13. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Hodnocení testu na detekci cytochromoxidázy od filmy Erbalachema; Mikro-La-Test OXItest; kontrolní kmen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 24 hod, 37°C	22
Tabulka 2: Výsledek testu pro <i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolována z BAL; 24 hod, 35°C	25
Tabulka 3: SOP Identifikace bakteriálních izolátů ⁽⁴⁶⁾	29
Tabulka 4: Místa působení antibiotik u infekcí způsobených <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Tabulka 5: Hlavní skupiny β -laktamáz (rozdělení dle Amblera). ⁽²⁰⁾	37
Tabulka 6: Degradční produkty meropenemu a jeho molekulové hmotnosti ⁽²⁰⁾	40

14. POUŽITÁ LITERATURA

1. ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero, c1998, 1 sv. (různé stránkování). ISBN 80-902-9062-0.
2. AMIRI-ELIASI, Bijan a Catherine FENSELAU. Characterization of Protein Biomarkers Desorbed by MALDI from Whole Fungal Cells. *Analytical Chemistry*. 2001, vol. 73, issue 21, s. 5228-5231. DOI: 10.1021/ac010651t. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac010651>
3. BABIC, M, A HUJER a R BONOMO. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates*. 2006, vol. 9, issue 3, s. 142-156. DOI: 10.1016/j.drug.2006.05.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764606000446>
4. BEBRONE, Carine. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*. 2007, vol. 74, issue 12, s. 1686-1701. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.05.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295207003309>
5. BEDNÁŘ, Marek et al. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Mavril, 1996, s. 246-247. ISBN 80-2380-297-6.
6. BERKA, R. M.; GRAY, G. L.; VASIL, M. L. Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 1981, 34.3: 1071-1074.
7. BJORN, M. J., et al. Incidence of exotoxin production by *Pseudomonas* species. *Infection and immunity*, 1977, 16.1: 362-366.

8. CARBONNELLE, B et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008-10-03, vol. 46, issue 10, s. 3361-3367. DOI: 10.1128/JCM.00569-08. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00569-08>
9. CORNAGLIA, Giuseppe et al. Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007, vol. 29, issue 4, s. 380-388. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2006.10.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092485790600464X>
10. COSTERTON, J. W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 1999, vol. 284, issue 5418, s. 1318-1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5418.1318>
11. DOMIN, Mark A., Kevin J. WELHAM a David S. ASHTON. The Effect of Solvent and Matrix Combinations on the Analysis of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*. č. 13, s. -. DOI: 10.1002/. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19990228\)13:4%3C222::AID-RCM440%3E3.0.CO;2-Y/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0231(19990228)13:4%3C222::AID-RCM440%3E3.0.CO;2-Y/pdf)
12. DORTET, L., L. POIREL a P. NORDMANN. Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012-10-12, vol. 50, issue 11, s. 3773-3776. DOI: 10.1128/JCM.01597-12. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01597-12>
13. ESPY, M. J et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006-01-17, vol. 19, issue 1, s. 165-256. DOI: 10.1128/CMR.19.1.165-256.2006. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>

14. FEDERHEN, Scott. The NCBI taxonomy database. *Nucleic acids research*, 2012, 40.D1: D136-D143.
15. GARCIA-GARROTE, Fernando; CERCENADO, Emilia; BOUZA, Emilio. Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *Journal of clinical microbiology*, 2000, 38.6: 2108-2111. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/38/6/2108.full>
16. GIAMARELLOU, Helen. Therapeutic guidelines for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000, vol. 16, issue 2, s. 103-106. DOI: 10.1016/S0924-8579(00)00212-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857900002120>
17. HANCOCK, Robert E. W. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*. 1998, vol. 27, s1, S93-S99. DOI: 10.1086/514909. Dostupné z: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/514909>
18. HENTZER, M et al. Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. *Journal of Bacteriology*. 2001-09-15, vol. 183, issue 18, s. 5395-5401. DOI: 10.1128/JB.183.18.5395-5401.2001. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.183.18.5395-5401.2001>
19. HRABAK, J et al. Capenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011-08-30, vol. 49, issue 9, s. 3222-3227. DOI: 10.1128/JCM.00984-11. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00984-11>
20. HRABÁK, Jaroslav, et al. Detekce karbapenemáz u enterobakterií pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (MS), fenotypových inhibičních testů a molekulárně-mikrobiologickými technikami. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 2012, 21.4: 148-156.

21. HWANG, Jaulang et al. Functional domains of pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in E. coli. *Cell*. 1987, vol. 48, issue 1, s. 129-136. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90363-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867487903631>
22. JULÁK, J. *Klinicky významné bakterie*. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-588-6.
23. KESSLER, Efrat, et al. Elastase and the LasA protease of Pseudomonas aeruginosa are secreted with their propeptides. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273.46: 30225-30231.
24. LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 2002, 95.Suppl 41: 22. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1308633/pdf/12216271.pdf>
25. LAU, G. W et al. The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection. *Trends in Molecular Medicine*. 2004, vol. 10, issue 12, s. 599-606. DOI: 10.1016/j.molmed.2004.10.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491404002606>
26. LAU, G. W et al. Pseudomonas aeruginosa Pyocyanin Is Critical for Lung Infection in Mice. *Infection and Immunity*. 2004-06-22, vol. 72, issue 7, s. 4275-4278. DOI: 10.1128/IAI.72.7.4275-4278.2004. Dostupné z: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.72.7.4275-4278.2004>
27. LEE, V. T et al. Activities of Pseudomonas aeruginosa Effectors Secreted by the Type III Secretion System In Vitro and during Infection. *Infection and Immunity*. 2005-02-23, vol. 73, issue 3, s. 1695-1705. DOI: 10.1128/IAI.73.3.1695-1705.2005. Dostupné z: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.73.3.1695-1705.2005>
28. LESSNAU, Klaus-Dieter. Medscape Medical News [online]. 2014 [cit. 2014-03-25]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/226748-clinical>

29. LIANG, X et al. Identification of a Genomic Island Present in the Majority of Pathogenic Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2001-02-01, vol. 183, issue 3, s. 843-853. DOI: 10.1128/JB.183.3.843-853.2001. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.183.3.843-853.2001>
30. LIGOZZI, M et al. Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002-05-01, vol. 40, issue 5, s. 1681-1686. DOI: 10.1128/JCM.40.5.1681-1686.2002. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.40.5.1681-1686.2002>
31. LIU, PINGHUI V.; WANG, Shipeng. Three new major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical microbiology*, 1990, 28.5: 922-925
32. LIU, PINGHUI V. Survey of hemolysin production among species of pseudomonads. *Journal of bacteriology*, 1957, 74.6: 718.
33. MEYER, J. M. a M. A. ABDALLAH. The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *Journal of General Microbiology*. 1978-08-01, vol. 107, issue 2, s. 319-328. DOI: 10.1099/00221287-107-2-319. Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00221287-107-2-319>
34. MICHEL-BRIAND, Yvon a Christine BAYSSE. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*. 2002, vol. 84, 5-6, s. 499-510. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01422-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908402014220>
35. MIRIAGOU, V et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010, vol. 16, issue 2, s. 112-122. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03116.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-0691.2009.03116.x>
36. NORDMANN, Patrice, Thierry NAAS a Laurent POIREL. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*. 2011, vol.

17, issue 10, s. 1791-1798. DOI: 10.3201/eid1710.110655. Dostupné z:
http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/10/11-0655_article.htm

37. PALLERONI, Norberto J. *Pseudomonas*. Topley [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2010-03-15 [cit. 2014-03-09]. DOI: 10.1002/9780470688618.taw0062. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/9780470688618.taw0062>

38. PELEG, Anton Y. a David C. HOOPER. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *New England Journal of Medicine*. 2010-05-13, vol. 362, issue 19, s. 1804-1813. DOI: 10.1056/NEJMra0904124. Dostupné z:
<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0904124>

39. PODSTATOVÁ, Hana. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena: učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium*. 1. vyd. Olomouc: Epava, 2001, 164 - 165. ISBN 8086297071

40. POOLE, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 2002, vol. 92, s1, 55S-64S. DOI: 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.8.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.8.x>

41. PORTEOUS, L.Arlene, Franco WIDMER a Ramon J SEIDLER. Multiple enzyme restriction fragment length polymorphism analysis for high resolution distinction of *Pseudomonas (sensu stricto)* 16S rRNA genes. *Journal of Microbiological Methods*. 2002, vol. 51, issue 3, s. 337-348. DOI: 10.1016/S0167-7012(02)00108-2. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701202001082>

42. RAN, H., D. J. HASSETT a G. W. LAU. Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011-05-01, vol. 100, issue 24, s. 14315-14320. DOI: 10.1073/pnas.2332354100. Dostupné z:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2332354100>

43. SADIKOT, Ruxana T et al. Pathogen–Host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005, vol. 171, issue 11, s. 1209-1223. DOI: 10.1164/rccm.200408-1044SO. Dostupné z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200408-1044SO>
44. SADIKOT, Ruxana T et al. Pathogen–Host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005, vol. 171, issue 11, s. 1209-1223. DOI: 10.1164/rccm.200408-1044SO. Dostupné z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200408-1044SO>
45. SADOVSKAYA, Irina et al. Structural characterization of the outer core and the O-chain linkage region of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5. *European Journal of Biochemistry*. 2000, vol. 267, issue 6, s. 1640-1650. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01156.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.2000.01156.x>
46. SCHARFEN, Josef. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. 1. vyd. Praha: Nucleus HK, 2013, s. 40-41. Mikrobiologie. ISBN 978-80-87009-32-1.
47. SOKOL, Pamela A.; OHMAN, Dennis E.; IGLEWSKI, Barbara H. A more sensitive plate assay for detection of protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical microbiology*, 1979, 9.4: 538.
48. SPILKER, T et al. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004-05-06, vol. 42, issue 5, s. 2074-2079. DOI: 10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004>
49. VADILLO-RODRIGUEZ, V., S. R. SCHOOLING a J. R. DUTCHER. In Situ Characterization of Differences in the Viscoelastic Response of Individual Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cells. *Journal of Bacteriology*. 2009-08-10, vol. 191, issue 17, s. 5518-5525. DOI: 10.1128/JB.00528-09. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00528-09>

50. VOTAVA, M et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, s. 32-33. ISBN 80-902896-6-5.
51. VOTAVA, M. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. 1. vydání. Brno, Hortus, spol. s.r.o. 2000. ISBN 80-238-5058-X.
52. WHITCHURCH, C. B et al. Phosphorylation of the *Pseudomonas aeruginosa* Response Regulator AlgR Is Essential for Type IV Fimbria-Mediated Twitching Motility. *Journal of Bacteriology*. 2002-08-15, vol. 184, issue 16, s. 4544-4554. DOI: 10.1128/JB.184.16.4544-4554.2002. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.184.16.4544-4554.2002>
53. WIESER, Andreas et al. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012, č. 93, s. 965-974. DOI: 10.1007/s00253-011-3783-4. Dostupné z: http://download.springer.com/static/pdf/500/art%253A10.1007%252Fs00253-011-3783-4.pdf?auth66=1393688239_fedda4673024a55369ba01bf179626ea&ext=.pdf
54. www.erbalachema.com. <https://www.erbalachema.com/produktova-podpora/pracovni-navody/pracovni-navody-mikrobiologie/> [online]. [cit. 2014-03-02]. Dostupné z: <https://www.erbalachema.com/attachments/OXItest-CZ+SK+EN+RU+PL.pdf>
55. www.erbalachema.com. <https://www.erbalachema.com/produktova-podpora/pracovni-navody/pracovni-navody-mikrobiologie/> [online]. [cit. 2014-03-02]. Dostupné z: <https://www.erbalachema.com/attachments/NEFERMtest%2024-CZ+SK+EN+RU+PL.pdf>

15. PŘÍLOHY



Obrázek 4: *Pseudomonas aeruginosa* izolována z BAL, Krevní agar, kultivace: 35°C 48 hodin.
Po prodloužené kultivaci je pozorována výrazná zóna β hemolýzy.



Obrázek 5: *Pseudomonas aeruginosa* izolována z BAL, ENDO agar, 35°C, 24 hodin.
Na agaru pozorujeme světlé kolonie v barvě agaru, nedochází ke štěpení laktózy.