

Svoluji se zapůjčením své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně citovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

Identifikace epidemických kmenů *Burkholderia*
cenocepacia v populaci pacientů s cystickou
fibrózou

Šárka Vošahlíková

Praha 2005

Vedoucí diplomové práce byl MUDr. Ondřej Cinek, Ph.D.

Prohlašuji, že práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury a pod vedením svého školitele.

Barbora Hradilová

Poděkování

Ráda bych především poděkovala:

Dr. Pavlu Dřevínkovi za uvedení do studovaného problému, skvělou spolupráci a přátelskou atmosféru během naší práce,

Dr. Ondřeji Cinkovi za skvělý dohled při vypracovávání mé diplomové práce, podporu a za blízkou neformální spolupráci,

Dr. Alexandru Nemcovi za cenné rady v oblasti mikrobiologie a podnětné připomínky k mé práci,

Heleně Reitzové za skvělou, nejen technickou pomoc v laboratoři a přátelský přístup k mé osobě,

celému kolektivu Laboratoře molekulární genetiky, za možnost být jeho součástí a za přátelskou atmosféru v níž jsem mohla pracovat.

Diplomová práce vznikla v letech 2003 – 2005, v rámci grantu Ministerstva zdravotnictví ČR (grant IGA 6568-3), Fakultní nemocnice Motol (interní grant 9705).

SEZNAM ZKRATEK.....	6
1 ÚVOD	8
1.1 Východisko	8
1.2 Cíl práce	9
2 PŘEHLED LITERATURY	10
2.1 Burkholderia cepacia.....	10
2.1.1 Výskyt v prostředí a u lidí.....	10
2.1.2 Genetické zvláštnosti <i>B. cepacia</i>	11
2.1.3 <i>Burkholderia cepacia</i> a cystická fibróza.....	11
2.1.4 Heterogenita <i>Burkholderia cepacia</i>	12
2.1.5 Genomovary u pacientů s CF a v prostředí.....	15
2.1.6 Distribuce genomovarů v populaci pacientů s CF	15
2.1.7 Přenosné kmeny a jejich příklady	17
2.2 Identifikace a typizace bakterií komplexu Burkholderia cepacia	19
2.2.1 Identifikace bakterií	19
2.2.2 Typizace bakterií.....	20
2.2.3 Genotypové typizační metody	22
3 MATERIÁL A METODY	25
3.1 Materiál	25
3.1.1 Vzorky od CF pacientů infikovaných <i>B. cenocepacia</i>	25
3.1.2 Laboratorní přístroje a pomůcky	25
3.1.3 Spotřební materiál.....	26
3.2 Metody	26
3.2.1 Extrakce DNA z kultury	26
3.2.2 RAPD typizace	27
3.2.3 Detekce BCESM	31
3.2.4 Detekce <i>cbIA</i> genu.....	33
3.2.5 PFGE typizace	35

4	VÝSLEDKY	40
4.1	RAPD	40
4.2	Makrorestrikční analýza	41
4.3	Porovnání RAPD a PFGE	45
4.4	Detekce genu <i>cbIA</i> a <i>BCESM</i>	45
4.5	Porovnání klonu <i>CZ1</i> s ostatními známými epidemickými kmeny	45
5	DISKUZE	47
5.1	Epidemický kmen <i>CZ1</i>	47
5.1.1	Nález nového epidemického kmene <i>B. cenocepacia</i>	47
5.1.2	Porovnání se známými epidemickými kmeny	48
5.1.3	Situace v kanadských centrech pro léčbu CF	49
5.1.4	Příčiny rozsevu <i>B. cenocepacia</i>	49
5.1.5	Infekce Bcc u pacientů nemajících CF	51
5.4	Metodické aspekty	52
5.1.6	RAPD	52
5.1.7	Makrorestrikční štěpení <i>SpeI</i> , <i>XbaI</i> a PFGE	52
6	ZÁVĚR	55
7	PŘÍLOHY – PUBLIKOVANÉ PRÁCE	56
7.1	původní článek	56
7.2	obsah ústního sdělení	61
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	66

SEZNAM ZKRATEK

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism; polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů
Bc	<i>Burkholderia cepacia</i>
Bcc	<i>Burkholderia cepacia</i> complex: komplex <i>Burkholderia cepacia</i>
BCESM	<i>B. cepacia</i> epidemic strain marker: genetický marker epidemických kmenů komplexu <i>B. cepacia</i>
BCSA	<i>Burkholderia cepacia</i> selective agar; selektivní agar pro <i>B. cepacia</i>
CCM	Czech Collection of Microorganisms; česká sbírka mikroorganismů
CF	Cystická fibróza
CFLP	Cleavase Fragment Length Polymorphism
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; transmembránový regulátor vodivosti iontů; mutace v jeho genu způsobují cystickou fibrózu
ET12	Electrophoretic type 12; epidemický kmen identifikovaný v centrech CF v Kanadě a Velké Británii
MLST	Multilocus sequence typing: fingerprintová metoda využívající sekvenčních polymorfismů několika lokusů
OFPBL	Oxidative-fermentative-polymixin-bacitracin-lactose; pevná selektivní půda pro izolaci <i>B. cepacia</i> ze sputa pacientů nemocných CF
PC agar	<i>Pseudomonas cepacia</i> agar
PCR	Polymerase chain reaction: polymerázová řetězová reakce
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis: gelová elektroforéza v pulzním poli
PHDC	Philadelphia – Washington, DC: Epidemický kmen <i>B. cepacia</i> , který byl identifikován na východním pobřeží USA
RAPD	Random amplified polymorphic DNA assay: fingerprintová metoda založená na náhodné amplifikaci polymorfních úseků DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism: polymorfismus délky štěpených fragmentů
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin

TSB Tryptophan soya buyon: tekutá půda s tryptofanem a sojovým extraktem

1 Úvod

1.1 Východisko

Cystická fibróza (CF) je závažné dědičné onemocnění, které podstatně ovlivňuje zdravotní stav pacientů a výrazně zkracuje délku jejich života. Hlavní příčinou nepříznivé prognózy jsou plicní infekce. Plíce pacientů s CF jsou časně infikovány celou řadou bakterií, které je obtížné či nemožné eradikovat. Spolupůsobí zde zvýšená vazkost hlenu způsobená chorobou a rezistence infikujících bakterií k celé řadě antibiotik.

V naší populaci pacientů s CF patří mezi nejvýznamnější patogeny způsobující plicní komplikace *Pseudomonas aeruginosa* a bakterie komplexu *Burkholderia cepacia*. Nejobávanějším patogenem infikujícím plíce pacientů je *Burkholderia cepacia*. Tato bakterie se vyznačuje vysokou primární rezistencí k většině antibiotik a je schopna formovat velmi rezistentní růstovou formu biofilmu. Infekce a zánět mají pak negativní vliv na klinický stav nemocných i na jejich prognózu. Proto začala být celosvětově této infekci u nemocných CF věnována velká pozornost brzy po tom, co byla objevena, a již před dvaceti lety byl znám její negativní vliv na mortalitu (TABLAN *et al.*, 1985).

Prevalence infekce bakteriemi komplexu *B. cepacia* u nemocných CF je v různých zemích velmi rozdílná a i klinický dopad infekce může být různý: tyto rozdíly jsou jak výrazem rozdílné imunitní odpovědi mezi jednotlivými pacienty, tak zejména rozdílných epidemiologických charakteristik kmenů *B. cepacia* vyskytujících se mezi nemocnými.

Jediným způsobem, jak zabránit případným komplikacím infekce *B. cepacia*, je zajistit, aby k infekci u pacienta vůbec nedošlo. Snaha zabránit šíření infekce *B. cepacia* vedla centra pro léčbu CF k zavedení přísných opatření separujících jednotlivé pacienty podle jejich mikrobiologického nálezu. Pokud má být tento systém co nejvíce účinný, je třeba brzká a přesná diagnostika – od senzitivní a specifické detekce bakterie přes její zařazení do druhu až po identifikaci příbuznosti kmene s jinými kmeny infikujícími danou populaci pacientů s CF. Klasické kultivační techniky toto samy v případě *B. cepacia* nedokážou, ale molekulárně genetickými metodami je možno tyto klinicky zásadně důležité cíle splnit.

1.2 Cíl práce

Specifickým cílem diplomové práce bylo:

- 1) Zjistit míru genetické příbuznosti mezi izoláty *B. cepacia*, které byly získány ze sput českých pacientů a náležejí do stejného genetického druhu (genomovaru).
- 2) Užitím fingerprintových metod zjistit, zda je v české populaci pacientů s CF přítomen epidemický kmen nebo kmény, které jsou zodpovědné za šíření infekce.
- 3) Zjistit příbuznost epidemického kmene, přítomného v české CF populaci, se známými epidemickými kmény z jiných populací (ET 12, PHDC, kmény označované jako RAPD 01, 04, 06).

2 Přehled literatury

2.1 *Burkholderia cepacia*

2.1.1 Výskyt v prostředí a u lidí

Bakterie *Burkholderia cepacia* jsou gramnegativní, aerobní, nesporulující tyče, které byly prvně popsány v roce 1950 jako rostlinné patogeny způsobující hnilobu cibule (BURKHOLDER, 1950). *B. cepacia* se v prostředí vyskytuje ubikvitně, zejména v půdě kolem kořenů rostlin, s některými z nichž žije v symbióze (PARKE & GURIAN-SHERMAN, 2001). Byla ale nalezena i ve stojatých vodách, v řekách, jezerech a v moři. Hledání přirozených rezervoárů této bakterie je však komplikováno nedostatečnou citlivostí běžně používaných kultivačních metod (MILLER *et al.*, 2002) – je možné, že bakterie se vyskytuje v prostředí daleko běžněji, než se nyní domníváme. *B. cepacia* produkuje rostlinné hormony, látky s antifungálním účinkem (např. cepacin (PARKER *et al.*, 1984) i látky s účinkem antibakteriálním: chinolon pseudan nebo fenazin (CARTWRIGHT *et al.*, 1995), který potlačuje rostlinná onemocnění způsobená jinými půdními bakteriemi. *B. cepacia* metabolizuje organické odpadní látky typu ftalátů nebo chlorovaných uhlovodíků a některé kmeny jsou dokonce schopné metabolizovat penicilin G jako zdroj uhlíku. Díky těmto mimořádným vlastnostem byly bakterie komplexu *B. cepacia* použity v 90. letech minulého století jako biodegradační a biopesticidní agens. Potenciální využití *B. cepacia* pro zemědělské účely se však dostalo do ostrého rozporu s jejím prokázaným patogenním účinkem.

Jako oportunní patogen v plicích pacientů s CF byla poprvé popsána na přelomu 70. a 80. let 20. století (LYCZAK *et al.*, 2002). Kromě pacientů s CF *B. cepacia* ohrožuje pacienty s primárním i sekundárním poškozením imunity (pacienti s chronickou granulomatózou a nemocné na anesteziologicko – resuscitačním oddělení). Ve vyjimečných případech může také infikovat pacienty, kteří před onemocněním byly zcela zdraví (mozkový absces způsobený *B. cepacia* nebo kožní léze na nohou vojáků při výcviku v tropech, tzv. swamp foot).

2.1.2 Genetické zvláštnosti *B. cepacia*

Prizpůsobivost a různorodost této bakterie lze částečně vysvětlit pomocí genetiky. *B. cepacia* má mezi bakteriemi unikátní organizaci genomu. Jeho velikost se pohybuje v rozmezí 6-9 Mb a je rozdělen do 2-4 replikonů (chromozomů) (PARKE & GURIAN-SHERMAN, 2001) přestože se jedná o prokaryotický organismus. Za různorodost bakterie jsou zodpovědné četné inzerční sekvence, které mají schopnost se v rámci genomu přemísťovat a tak způsobovat mutace (LESSIE *et al.*, 1996). Tyto inzerční sekvence jsou obvykle součástí oblastí DNA, které nesou větší počet faktorů virulence. Takovéto úseky se označují jako ostrovy patogenity (pathogenicity islands).

V genomu kmene J 2315, který náleží do genomovaru III komplexu *B. cepacia* a je reprezentantem nebezpečné přenosné linie ET 12, byl popsán ostrov patogenity o velikosti 32 kb (BALDWIN *et al.*, 2004). Označuje se jako *cci* (*cenocepacia* island) a obsahuje 35 hypotetických genů. Mezi tyto geny patří geny pro quorum sensing systém, řada transkripčních regulátorů nebo oblast BCESM (viz níže). Organizace faktorů patogenity do takovýchto ostrovů zajišťuje společný přenos těchto faktorů a tím i vysokou patogenitu bakterie. Je pravděpodobné, že obdobná organizace je přítomna i u jiných, méně studovaných kmenů této bakterie.

2.1.3 *Burkholderia cepacia* a cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) je vrozené, autozomálně recesivní dědičné onemocnění, které se v kavkazské populaci vyskytuje přibližně ve frekvenci 1 : 2500 živě narozených dětí. Příčinou CF jsou mutace v obou alelách genu, který kóduje protein označovaný jako Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator - CFTR (RIORDAN *et al.*, 1989). Tento protein za normálních okolností funguje jako chloridový kanál umístěný na apikální straně epitelálních buněk. V případě CF je však funkce tohoto iontového kanálu narušena nebo je kanál zcela nefunkční. Tento defekt se projevuje nefunkčností transportu chloridových iontů přes apikální buněčnou membránu. Ačkoli defekt kanálu není omezen na respirační trakt, právě postižení dýchacích cest je nejzávažnější. Dochází zde ke zvýšenému toku sodných iontů do buňky a tím

k zahušťování sekretu a tvorbě vazkého hlenu. Ten ucpává dýchací cesty a stává se tak ideálním místem pro chronickou infekci a na ni reagující zánětlivý proces destruující plicní tkáň.

V prvních letech života je dýchací ústrojí pacienta s CF nejčastěji infikováno bakteriemi *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae*; později se hlavními patogeny stávají *Pseudomonas aeruginosa* a bakterie z komplexu *Burkholderia cepacia* (LYCZAK *et al.*, 2002). Infekce bakteriemi z komplexu *Burkholderia cepacia* patří mezi klinicky nejzávažnější; a to ze tří důvodů (i) bakterie jsou primárně rezistentní na většinu známých antibiotik, a infekce je tedy prakticky nevyléčitelná – jednou kolonizovaný pacient má tak malou pravděpodobnost eradikace plicní infekce *B. cepacia*, (ii) bakterie se mohou snadno šířit z pacienta na pacienta (LIPUMA, 1998; MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2001) a (iii) infekce zpravidla závažně zhoršuje klinický stav pacienta: od mnoho let trvajících plíživého zhoršování plicních funkcí až po rychle smrtící septický stav s nekrotizující pneumonií (cepacia syndrom) (ISLES *et al.*, 1984; PARKE & GURIAN-SHERMAN, 2001). Jen zřídka kdy infekce vůbec neovlivňuje průběh onemocnění CF.

2.1.4 Heterogenita *Burkholderia cepacia*

Výrazně vyjádřená heterogenita v klinickém obraze infekce *B. cepacia* u pacientů s cystickou fibrózou je bezesporu způsobená též růzností imunitní odpovědi pacientů. Hlavně se však dá očekávat, že je způsobená heterogenitou samého původce infekce - kmenů *B. cepacia* infikující jednotlivé nemocné. To vedlo k podrobné genetické analýze bakterie a k identifikaci jednotlivých druhů. Peter Vandamme a jeho spolupracovníci prokázali v druhé polovině 90. let, že druh označovaný jako *Burkholderia cepacia* lze genotypovými metodami rozdělit do dalších podskupin, které se taxonomicky označují jako genomovary (VANDAMME *et al.*, 1997).

Před definicí genomovaru je třeba zopakovat definice několika základních pojmů. Jako izolát se označuje populace buněk, které jsou odvozené od jedné kolonie na izolační plotně. Základní taxonomickou jednotkou je kmen, který tvoří linii bakteriálních izolátů shodných vlastností. Vzájemně podobné kmény odlišné od kmenů ostatních tvoří druh, příbuzné druhy se pak sdružují do rodu.

Pro komplex *Burkholderia cepacia* byla zavedena zvláštní taxonomická jednotka: genomovar. Jde o taxonomickou jednotku, která odpovídá bakteriálnímu druhu definovaného pouze pomocí molekulárně genetických metod. Od jiných druhů nelze tuto taxonomickou jednotku odlišit klasickými mikrobiologickými metodami, jako jsou kultivační charakteristiky a testy biochemických vlastností. Kmeny původně označované jako *Burkholderia cepacia* se tak nejprve rozdělily do pěti genomovarů (I-V; rok 1997) (VANDAMME *et al.*, 1997). Později přibyly další čtyři (COENYE *et al.*, 2001a; COENYE *et al.*, 2001c; VANDAMME *et al.*, 2002). V současné době probíhá studie desátého genomovaru. Ty jsou společně sdružené pod pojmem *Burkholderia cepacia* komplex (Bcc; viz tab.1).

Vzhledem k tomu, že se v první zprávě o existenci genomovarů nepodařilo nalézt charakteristické fenotypové vlastnosti, které by vedly k jejich jasné identifikaci, autoři nepřistoupili k pojmenování genomovarů binomickými názvy. Později došlo k přiřazení binomického názvu všem genomovarům na základě nálezu typických fenotypových znaků, jenž jsou charakteristické pro jednotlivé genomovary (PARKE & GURIAN-SHERMAN, 2001). Dvouslovné označení *Burkholderia cepacia* tak přísluší pouze genomovaru I, který obsahuje kmen popsáný jako úplně první, ten, co způsobuje hnilobu cibule. Určitou výjimkou z názvosloví představuje genomovar III, u něhož se nepodařilo detekovat specifické fenotypové vlastnosti a tak dostal binomický název jen díky své klinické důležitosti (VANDAMME *et al.*, 2003).

Rozřazení izolátů do příslušných genomovarů na základě stanovení typických fenotypových vlastností se neuvádí, protože je to technicky náročné a nepraktické. Detekce genomovarů se provádí pomocí PCR metodiky, která využívá specifické primery zaměřené na jedinečné nukleotidové sekvence jak celého komplexu *B. cepacia*, tak i každého genomovaru. Koncem 90. let byly vyvinuty testy PCR zaměřené na polymorfismy v oblasti genů pro 16S a 23S rRNA (LIPUMA *et al.*, 1999); s rozšiřováním komplexu *B. cepacia* o nové genomovary se však tato detekce ukázala nedostačující, protože neumožňovala rozlišit od sebe všechny genomovary komplexu. Vhodnou náhradou se stal gen *recA*, který vykazuje 94 - 95% sekvenční podobnost mezi jednotlivými genomovary a dovoluje tak specificky detekovat skupinu Bcc jako celek i jednotlivé genomovary mezi sebou. Rozdíly v sekvencích

RecA genu umožňují ještě další rozčlenění v rámci genomvaru III na podskupiny A, B, C a D (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2000).

Tabulka 1. Přehled názvů všech genomvarů komplexu *Burkholderia cepacia*.

Species (druh)	Genomovar	Reference
<i>Burkholderia cepacia</i>	genomovar I	(BURKHOLDER, 1950)
<i>Burkholderia multivorans</i>	genomovar II	(VANDAMME <i>et al.</i> , 1997)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	genomovar III	(VANDAMME <i>et al.</i> , 2003)
<i>Burkholderia stabilis</i>	genomovar IV	(VANDAMME <i>et al.</i> , 2000)
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	genomovar V	(GILLIS <i>et al.</i> , 1995)
<i>Burkholderia dolosa</i>	genomovar VI	(COENYE <i>et al.</i> , 2001b)
<i>Burkholderia ambifaria</i>	genomovar VII	(COENYE <i>et al.</i> , 2001c)
<i>Burkholderia anthina</i>	genomovar VIII	(VANDAMME <i>et al.</i> , 2002)
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	genomovar IX	(VANDAMME <i>et al.</i> , 2002)
<i>Burkholderia ubonensis</i>	genomovar X	(VERMIS <i>et al.</i> , 2002)

2.1.5 Genomovary u pacientů s CF a v prostředí

Přestože všechny genomovary (s výjimkou genomvaru X) byly alespoň jednou nalezeny ve sputu od pacientů s CF, zdaleka nejčastěji je jako původce infekce nalézán genomvar III nebo II. Přitom právě genomvar III je významně asociován se zvýšenou mortalitou infikovaných pacientů (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2001). Je tomu tak též po provedené transplantaci plic, která se stává poslední léčebnou metodou u pacientů nacházejících se v globální respirační insuficienci (DE SOYZA *et al.*, 2001). Genomvar III je také nebezpečný rizikem epidemického rozsevu infekce v populaci pacientů s CF, neboť k tomuto druhu patří nejvíce známých přenosných kmenů. Přenos mezi pacienty byl však popsán i v případě genomvarů I, II a VI a fatální septické stavy jsou známy u pacientů s genomvarem II (BIDDICK *et al.*, 2003; SEGONDS *et al.*, 1999). Prozatím tak neexistuje jasná odpověď na otázku, zda některý z genomvarů má větší schopnost způsobovat závažné infekce, a žádný z genomvarů tedy nelze považovat za původce příznivější varianty infekce.

Do skupiny environmentálních genomvarů patří především genomvar I, který původcem již zmíněné hniloby cibule, genomvar VII, do kterého náležejí potenciálně agronomicky využitelné biopesticidní kmeny (PARKE & GURIAN-SHERMAN, 2001) a genomvar III. Právě výskyt genomvaru III v půdě poukázal na nebezpečí získání infekce Bcc ze zevního prostředí a znamenal vážný argument proti využití biopesticidních kmenů, které mohou cestou horizontálního genového přenosu získat vlastnosti lidského patogenu (COENYE & VANDAMME, 2003). Potvrzení možnosti, že infekci lze získat ze zevního prostředí, přinesl nález epidemického kmene PHDC v zemědělsky obdělávané půdě (LIPUMA *et al.*, 2002).

2.1.6 Distribuce genomvarů v populaci pacientů s CF

Významným ukazatelem při popisu epidemiologické situace je stanovení distribuce jednotlivých genomvarů v populaci. Obecně platí, že většina pacientů s CF, která je infikována bakteriemi komplexu Bcc, je infikována genomvarem III (JONES *et al.*, 2001; LIPUMA *et al.*, 2001) nebo genomvarem II. V poměru zastoupení těchto dvou genomvarů je v Evropě viditelný určitý severo-j jižní gradient. V Británii a Francii je vysoké procento infekcí způsobeno genomvarem II

(BRISSE *et al.*, 2004; TURTON *et al.*, 2003). Naproti tomu ve státech jižní Evropy převládá genomvar III (Itálie (AGODI *et al.*, 2001), Portugalsko (CUNHA *et al.*, 2003)). V Severní Americe severojižní gradient není: v centrech pro léčbu CF v Kanadě je přítomen epidemický kmen genomvaru III a asi desetina infikovaných pacientů má genomvar II, v USA také převládá genomvar III, ale s vyšším výskytem genomvaru II.

Tabulka 2. Distribuce jednotlivých genomvarů mezi pacienty s CF infikovanými Bcc ve vybraných populacích (% jsou podíly genomvarů z celkového počtu infikovaných pacientů). Genomovary VIII až X nebyly ještě v době provedení citovaných prací popsány a jsou tedy pravděpodobně zahrnuty pod heslem “Neurčeno”. V Itálii byl dodatečně zaznamenán relativně vysoký výskyt vzácné *B. pyrrocinia* (genomvar IX) a *B. cenocepacia*, její *recA* podskupiny III-D (MANNO *et al.*, 2004).

Genomovar	Česká republika (DREVINEK <i>et al.</i> , 2002) 89 pacientů	Francie (BRISSE <i>et al.</i> , 2004) 153 pacientů	Itálie (AGODI <i>et al.</i> , 2001) 59 pacientů	USA (LIPUMA <i>et al.</i> , 2001) 606 pacientů	Kanada (SPEERT <i>et al.</i> , 2002) 475 pacientů
I	0	0	4,8	2,6	0,2
II	2	52	4,8	38	9,3
III	65	45	73	50	80
IV	0	1,3	3,2	0,2	3,8
V	0	0,6	0	5,1	1,6
VI	0	0	0	2	0
VII	0	0	0	0,7	0
Neurčeno	0	1,4	14	1,6	1,8

Výskyt infekce *B.cepacia* se u pacientů s CF významně liší mezi jednotlivými centry pro léčbu CF. Existují centra, jež nevykazují žádný záchyt *B.cepacia*, a naopak jsou oblasti, které se potýkají s prevalencí kolem 50 % (LIPUMA *et al.*, 2001; SPEERT *et al.*, 2002). Vyšší prevalenci hlásila centra, kde byl nalezen

přenosný kmen ET12 (centra v Torontu, Edinburghu nebo Manchesteru) nebo kmen PHDC (Philadelphia, Washington, DC).

Zastoupení jednotlivých genomovarů v české CF populaci bylo již stanoveno (DREVINEK *et al.*, 2002). Naprostá většina infekcí je způsobena genomovarem III, respektive jeho podskupinou IIIA.

Rozšíření genomovarů velmi hrubě odráží epidemiologickou situaci v populaci pacientů s CF. Převládající výskyt jednoho genomovaru napovídá, že by v takové populaci mohl být přítomen přenosný kmen. Naopak současný výskyt více genomovarů v populaci je nejspíše důsledek nezávislých infekcí bakteriemi ze zevního prostředí - takový nálezný svědčí pro efektivní separační režim, který brání epidemickému šíření infekce. Podle nejnovějších doporučení by měl separační systém zabránit i kontaktu mezi dvěma Bcc pozitivními pacienty, kteří jsou infikováni rozdílnými genomovary. Je totiž možné, že kmen jednoho genomovaru vytěsni z dýchacích cest kmen genomovaru druhého (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2001).

2.1.7 Přenosné kmene a jejich příklady

V roce 1990 byla uveřejněna první zmínka o přenosu bakteriálních kmenů Bcc mezi pacienty s CF (LIPUMA *et al.*, 1990). Poté byly ve většině center pro léčbu CF identifikovány epidemické kmene Bcc. Zjištění schopnosti přenosu bakteriálních kmenů vedlo ke zrušení všech akcí, kde docházelo k setkávání CF pacientů (např. letní tábory).

Nejznámějším příkladem přenosného kmene je kmen ET12 – elektroforetický kmen 12. Tento kmen se rozšířil v CF centrech v Kanadě a následně ve Velké Británii (JOHNSON *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 1995). Pro epidemický kmen ET12 je charakteristická přítomnost obřích vláken, která se označují jako cable pili. Tato vlákna dlouhá 2 – 4 μm a jsou přítomna pouze u ET12. Gen **cbIA**, který kóduje hlavní komponentu adhezinu obřích vláken, se využívá jako marker přenosného kmene ET12 (SAJJAN *et al.*, 1995). Kromě výše zmíněného kmene ET12 byly v Kanadě popsány další přenosné kmene, které byly označeny podle svého fingerprintového profilu na RAPD jako RAPD 01, 04, 06 (SPEERT *et al.*, 2002). Na východním pobřeží USA se vyskytuje epidemický kmen označovaný jako PHDC,

který již byl identifikován i v Evropě (COENYE *et al.*, 2004). Všechny tyto kmeny náleží do kmene *B. cenocepacia* (genomovar III). Liší se v příslušnosti k jednotlivým fylogenetickým podskupinám. Zatímco ET12 a RAPD 01, 04, 06 patří do podskupiny IIIA, PHDC náleží do podskupiny IIIB.

Obrázek 1. Elektronoptická fotografie bakteriální buňky, která náleží k epidemické linii ET12. Na jejím povrchu jsou vidět obří vlákna. Úsečka v levém horním rohu odpovídá délce 0,1 μm . Obrázek je použit z originální práce (SAJJAN *et al.*, 1995).



Obecnějším markerem epidemických kmenů je oblast DNA, popisovaná jako **BCESM** (*Burkholderia cepacia* epidemic strain marker). Jedná se o 1,4 kb dlouhou oblast, která kóduje negativní regulátor transkripce (*esmR*). Poprvé byla popsána u kmene ET12 (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 1997). BCESM je asociován s epidemicitou proto, že je součástí ostrova patogenity (BALDWIN *et al.*, 2004). Tento ostrov obsahuje například i geny pro lipázy, proteázy, hemolysiny (schopné indukovat apoptózu a degradaci fagocytů), katalázy a siderofory (transportní sloučeniny vázající ionty železa) (GOVAN & DERETIC, 1996). Nedávno bylo zjištěno, že v tomto ostrově se nalézá i gen pro quorum sensing systém. Ten reguluje expresi určitých faktorů v závislosti na množství přítomných bakterií. Pomocí tohoto systému dokáží bakterie přes signální molekuly (konkrétně N – acylhomoserinové

laktony) vnímat počet jedinců stejného druhu v prostředí. Pokud bakterie dosáhnou kritického množství, aktivují se dosud neexprimované geny. Tím se infekce s narůstající dobou a přibývajícím množstvím bakterií stává agresivnější a odolnější k léčbě (CONWAY *et al.*, 2002). Bakteriální masa, která na povrchu epitelu respiračního traktu vytváří exopolysacharidem stmelenu biofilmovou vrstvu, poskytuje jednotlivým buňkám mnohem vyšší stupeň ochrany před stresovými podněty z mikroprostředí.

Ani BCESM však nepředstavuje univerzální genetický marker epidemických kmenů. Jako příklad lze uvést přenosné kmeny PHDC (CHEN *et al.*, 2001) a Midwest (LIPUMA, 1998), které nejsou pozitivní ani na BCESM, ani na *cbla*. Genotypizační metody není tedy možné při identifikaci epidemických kmenů zastoupit žádným testováním markerů epidemicity.

Výskyt přenosných kmenů není výlučnou vlastností *B. cenocepacia*, ale přenosné kmeny jsou známy i mezi dalšími druhy Bcc. Jak dokládá například práce Biddickové a jejích spolupracovníků (BIDDICK *et al.*, 2003), epidemické kmeny jsou přítomny též v rámci *B. multivorans* (kmeny OHBM a TUL2), *B. cepacia* (DTN1) nebo *B. dolosa* (SLC6). Jejich rozšíření je však malé v porovnání s epidemickými kmeny genomovaru III.

2.2 Identifikace a typizace bakterií komplexu *Burkholderia cepacia*

2.2.1 Identifikace bakterií

Kultivace a identifikace *B. cepacia* z klinického materiálu není snadná. Její kolonie rostou pomalu (úspěšná kultivace vyžaduje 48-72 hodin) a navíc tyto drobné kolonie mohou být překryty jinými mikroorganismy. Kultivační techniky proto využívají kromě základního spektra vyšetřovacích obohacených pevných půd (krevní agar, čokoládový agar, MacConkey agar) i selektivní půdy. Používá se BCSEA tj. *Burkholderia cepacia* selective agar, OFPBL nebo PC agar. Tyto půdy však zachycují i bakterie rodu *Ralstonia pickettii* a *Burkholderia gladioli*, které je pak nutné dále odlišit, a to zejména biochemickými testy.

Komerčně dostupné identifikační systémy mohou zaměnit bakterie z komplexu *B. cepacia* za tzv. *B. cepacia*-like mikroorganismy, jakými jsou například

Burkholderia gladioli, *Ralstonia pickettii*, *Achromobacter* spp., *Pseudomonas* spp. či *S. maltophilia* (KISKA *et al.*, 1996; MCMENAMIN *et al.*, 2000). Americká studie, která ověřovala správnost identifikace Bcc v mikrobiologických laboratořích, prokázala, že více než 10 % bakterií bylo mylně označeno jako *B. cepacia* a naopak 36 % izolátů *B. cepacia* laboratoře vůbec jako *B. cepacia* neurčily (MCMENAMIN *et al.*, 2000; SHELLY *et al.*, 2000). Z toho vyplývá, že správnosti identifikace bakterií komplexu *B. cepacia* může zásadním způsobem prospět širší užití molekulárně genetických metod. Jedná se jednak o metody, které detekují sekvence společné celému komplexu, tak i o metody k odlišení jednotlivých genomovarů. Detekci Bcc i zařazení bakterií do genomovaru pomocí metody PCR jsme používali i my v naší studii.

2.2.2 Typizace bakterií

Typizací se rozumí testy vedoucí k identifikaci bakteriálního typu či kmene uvnitř téhož druhu.

Typizační metody můžeme rozdělit do dvou skupin: na metody fenotypové a genotypové. Fenotypové techniky jsou založeny na charakterizaci fenotypových vlastností. Vzhledem k tomu, že molekulárně genetické analýzy umožňují podrobnější analýzu studovaného materiálu, přestávají je moderní epidemiologické studie používat. K fenotypizaci lze využít znaků, které mohou být stanoveny laboratorně: biochemický profil, bakteriofágový typ, přítomnost antigenů na buněčném povrchu či citlivost na antibiotika. Vzhledem k tomu, že tyto vlastnosti ve značné míře podléhají selekčnímu tlaku, může docházet k jejich změnám.

Druhá skupina typizačních technik je představována metodami genotypovými. Ty jsou založené na analýze genetické informace organismu, genetického profilu. Porovnání těchto profilů umožňuje určit genetickou příbuznost vzorků. Shoduje-li se genetický profil dvou izolátů (tedy je danou metodou nerozlišitelný), pak se oba vyšetřované izoláty zařadí do stejného kmene.

Typizační techniky jsou charakterizovány pomocí kritérií, která pomáhají určit vhodnost dané metody pro konkrétní studovaný organismus. Těmito kritérii jsou typizovatelnost, reprodukovatelnost, rozlišovací síla, jednoduchost provedení a snadnost interpretace (TENOVER *et al.*, 1997). **Typovatelnost** vyjadřuje schopnost dané techniky poskytnout jednoznačný profil pro každý izolát daného bakteriálního

druhu; určuje, zda vůbec lze danou metodu k typizaci daných izolátů použít. Některé izoláty jsou určitou technikou netyповatelné. Například jinak téměř univerzální PFGE selhává při typizaci některých kmenů *Clostridium difficile*, protože před makrorestrikčním štěpením je DNA bakterie degradována DNázami (KATO *et al.*, 1994). **Reprodukovatelnost** vyjadřuje schopnost dané metody poskytnout stejný profil při opakovaném testování stejného vzorku. **Rozlišovací síla** vypovídá o pravděpodobnosti, s jakou lze rozlišit dva epidemiologicky nepříbuzné izoláty pomocí vybrané techniky. Je závislá na počtu typů a jejich relativní četnosti v populaci příslušného druhu. Dále pak **jednoduchost provedení**, která v sobě zahrnuje finanční náročnost, pracnost a potřebné technické vybavení a v neposlední řadě je to **snadnost interpretace výsledků**.

Neexistuje univerzální molekulárně typizační technika, kterou lze aplikovat na všechny mikroorganismy bez výjimky. V případech, kdy molekulárně epidemiologická studie zahrnuje delší časové období, je navíc výhodou pro konečnou interpretaci výsledků nespolehat se na jedinou metodu, ale podrobit studovaný soubor alespoň dvěma typizačním technikám (GOERING, 2004).

2.2.2.1 Fenotypové typizační techniky

Mezi tyto techniky patří:

Biotypizace, metoda, která používá biochemické testy, které prokazují schopnost izolátu metabolizovat či produkovat určitou látku (indol, sirovodík, xylóza, laktóza, pigment atd.). Na základě výsledků těchto testů lze odlišit jednotlivé biotypy. Biotyp je tedy definován jako varianta daného druhu odlišená biochemickými testy. Tato technika ve srovnání s ostatními vykazuje nedostatečnou reproducibilitu a rozlišovací sílu.

Stanovení **citlivosti na antibiotika** je technika, která má nízké náklady a výsledky jsou rychle dostupné, ale vzhledem k tomu, že ve zdravotnických zařízeních jsou bakterie pod značným selekčním tlakem, není metodou dosti průkaznou. Lze ji využít pouze k získání orientačních výsledků.

Serotypizace využívá reakce specifických protilátek s povrchovými antigeny bakterií. Pomocí serotypizace lze klasifikovat celou řadu mikroorganismů např. bakterie rodu *Salmonella*. Hlavním omezením této metody je případná zkřížená

reaktivita různých kmenů téhož druhu, která může vést k jejich falešnému přiřazení do téhož kmene.

2.2.3 Genotypové typizační metody

Všechny genotypové typizační metody jsou založeny na analýze odlišností v sekvencích chromozomální nebo extrachromozomální nukleové kyseliny mikroorganismů. Během typizace dochází k detekci určitých sekvencí, které jsou charakteristické pro daný typ či kmen. Genotypizace hraje důležitou roli ve studiu evoluce řady organismů včetně bakterií a umožňují zjištění epidemické situace tzn. zjišťování přenosných kmenů, které jsou zodpovědné za šíření infekce mezi pacienty.

Mezi genotypizační metody se řadí:

Southern blotting je metoda, která pomocí sondy detekuje určité úseky genomické DNA, naštěpené restrikční endonukleázou (OLIVE & BEAN, 1999). Jednotlivé fragmenty se nejprve elektroforeticky rozdělí. Poté jsou přeneseny na nylonovou membránu. Fragmenty DNA, pevně fixované na membráně, jsou podrobeny hybridizaci se specifickou, zpravidla radioaktivně nebo fluorescenčně značenou sondou, jež nasedá do místa odpovídající sekvence hledaného genu. Lze se zařadit i **ribotypizaci** (KOSTMAN *et al.*, 1995), při níž hybridizuje sonda s konzervativními oblastmi ribozomální DNA (16S a 23S rRNA).

Sekvenování, technika, která získává informaci o pořadí bází v molekule DNA. Využívá poznatku, že DNA dependetní DNA polymeráza není schopná rozpoznat rozdíl mezi dideoxyribonukleosidtrifosfáty (ddNTP) a deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP). DdNTP se od dNTP liší absencí hydroxylové skupiny na 3' konci, která slouží k navázání dalšího nukleotidu. Pokud dojde k připojení ddNTP, je syntéza řetězce ukončena. Jednotlivé fragmenty jsou poté elektroforeticky rozděleny a odtud je odečteno pořadí bází. Jejím širšímu užití v typizaci bakteriálních kmenů však zatím brání fakt, že doposud nebyly u řady bakteriálních druhů vybrány geny, jejichž sekvenční variabilita by byla přiměřená pro jednoznačné určování genetické příbuznosti izolátů. Principu sekvence využívá i typizační technika **MLST** (multilocus sequence typing) (ENRIGHT & SPRATT, 1999), která porovnává bakteriální kmene podle podobnosti alelických profilů několika (5-7) housekeepingových genů. Pro typizaci *B. cepacia* se tato technika jeví jako velice nadějná. Byla již standardizována například pro fylogeneticky blízkou *Burkholderia pseudomallei*.

CFLP (Cleavase Fragment Length Polymorfism) je metoda založená na rozpoznání a rozštěpení vlásenkové struktury enzymem cleavasou. Ke vzniku vlásenky dochází párováním bází téhož řetězce za zvýšené teploty. Vlášeny jsou unikátní pro jednotlivé kmeny a vznikají ještě před obnovením dvouřetězcové struktury. Cleavasa I rozeznává větvené smyčky a tam přeštípne řetězec. Výsledkem je směs různě velkých fragmentů DNA, které mohou být elektroforeticky rozděleny. Odchylky ve struktuře DNA jednotlivých bakteriálních kmenů se projevují jako odlišnosti ve fingerprintu.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorfism) představuje metodu založenou na specifické PCR amplifikaci pouze některých fragmentů, vzniklých naštěpením celé genomické DNA (VOS *et al.*, 1995). Tato technika zahrnuje tři kroky. Prvním z nich je vznik DNA fragmentů činností obvykle dvou restričních enzymů, které štěpí DNA s rozdílnou frekvencí (např. *EcoR I* a *Mse I*). Druhým krokem je ligace oligonukleotidových adaptérů se vzniklými fragmenty a specifická amplifikace. Té je docíleno užitím primerů, které jsou homologické s oligonukleotidovými adaptéry. Třetí krok představuje elektroforetická separace na polyakrylamidovém gelu.

RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) je metoda často používaná jako první screening velkého počtu vzorků (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 1996b). Jedná se o techniku, kdy dochází k amplifikaci polymorfních úseků DNA. Jako primer se využívá krátký oligonukleotid o náhodné sekvenci, který s dostatečnou afinitou hybridizuje s bakteriální DNA za nízké nasedací teploty. Počet a lokalizace komplementárních míst pro primer se mezi odlišnými kmeny bakteriálního druhu liší. Amplifikované fragmenty jsou následně elektroforeticky rozděleny. Výsledkem je fingerprintový profil, jehož proužky jsou charakteristické pro jednotlivé bakteriální kmeny. Lze sem zařadit i metody odvozené od RAPD. Jedná se o metody rep-PCR a BOX PCR, kdy jsou užity primery o známých sekvencích. Primery jsou komplementární k repetitivním úsekům bakteriální DNA tzv. REP elementům resp. BOX sekvencím.

Makrorestriční štěpení a PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) je označována jako zlatý standard molekulárně typizačních metod. Narostlé bakterie jsou zality do agarózových disků a potom lyzovány. Genomická DNA je naštěpena vzácně štěpicí restriční endonukleázou, v případě *B. cepacia* se jedná o *SpeI* (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2001). Takto připravené disky jsou nanášeny a

zality do agarózového gelu, vloženy do speciální elektroforetické vany a podrobeny elektroforéze v pulzním poli. Pulzní pole umožňuje separaci fragmentů DNA, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 10 – 1 000 kb. Fragmenty jsou vizualizovány po obarvení pomocí fluorescenčního barviva. Metoda vykazuje vynikající reprodukovatelnost, rozlišovací účinnost a má stanovena kritéria pro interpretaci nálezu (tzv. Tenoverova kritéria (TENOVER *et al.*, 1995)), která ostatním metodám chybí. Podle těchto kritérií lze jednotlivé izoláty rozdělit do několika kategorií: 1) nerozlišitelné izoláty, jejich restriční profil je shodný, tedy shodující se jak počtem, tak polohou proužků, 2) izoláty úzce příbuzné, jejichž profily se liší ve dvou až třech prouzcích. Tyto odlišnosti odpovídají jedině genetické změně, jako delecii, inzerci nebo bodovou mutaci, 3) izoláty potenciálně příbuzné, které vykazují ve svém restričním profilu čtyři až šest odlišností představující dvě nezávislé genetické změny a konečně 4) izoláty nepříbuzné, které se liší ve více jak sedmi prouzcích. Ty znamenají nejméně tři nezávislé genetické změny. Nevýhodou metody zůstává pracnost a časová náročnost; zpracování jednoho setu vzorků trvá tři až čtyři dny.

V případě genotypizace Bcc se nejčastěji užívají metody RAPD (COENYE *et al.*, 2002; MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 1996b; MCDOWELL *et al.*, 2004), BOX-PCR (COENYE *et al.*, 2002) a PFGE (AGODI *et al.*, 2002; COENYE *et al.*, 2002; HOLMES *et al.*, 1999; MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 1996b; SIDDIQUI *et al.*, 2001).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Vzorky od CF pacientů infikovaných *B. cenocepacia*

Na přítomnost bakterie komplexu *B. cepacia* bylo vyšetřeno sputum od 274 pacientů nemocných CF. Tyto izoláty byly získány v letech 1997 až 2003. Vzorky sput od 88 pacientů (32%) byly na přítomnost této bakterie jednoznačně pozitivní. U 26 pacientů (9,5 %) byla detekována pouze ojedinělá pozitivita, která nebyla potvrzena opakovaným testováním odebraného sputa. Během studie bylo analyzováno 83 klinických vzorků sput, které byly pozitivní na přítomnost kmene *Burkholderia cenocepacia* a patřily do *RecA* podskupiny A. Tyto izoláty byly získány od 67 pacientů nemocných cystickou fibrózou, z nichž 34 byli chlapci, 33 dívky. Soubor těchto pacientů představuje většinu (94%) pacientů kolonizovaných *B. cenocepacia*, kteří jsou léčeni v pražském centru CF. Od 51 pacientů jsme získali jeden vzorek. Od 16 pacientů jsme odebrali a analyzovali 2 izoláty, které byly získány v časovém rozmezí 22 – 54 měsíců (průměrná doba mezi odběry činila 38 měsíců).

3.1.2 Laboratorní přístroje a pomůcky

Centrifuga Mini spin plus	Eppendorf; Německo
Dokumentační systém KDS 1D	Kodak; Německo
Elektroforetická vana SHU 13 a zdroj napětí	Sigma Aldrich; Německo
Pipety	Finnpipette; Finsko Eppendorf; Německo,
Termocycler Biometra T gradient	Schoeller; Německo
Transiluminátor VL 50	Vilber Lourmat; Francie
Vortex ZX3	P-Lab; Česká republika

3.1.3 Spotřební materiál

Mikrozkumavky	Eppendorf; Německo
PCR desky	Eppendorf; Německo
PCR krycí folie	Eppendorf; Německo
Pipetovací špičky s filtrem	Sarstedt; Německo
Zkumavky 1,5ml	Sarstedt; Německo

3.2 Metody

3.2.1 Extrakce DNA z kultury

- **Materiál a chemikálie pro extrakci**

- | | |
|---------------------------------------|------------------------|
| 1) Bakteriologické jednorázové kličky | Medin; Česká republika |
| 2) CHELEX 100 | Sigma Aldrich; Německo |
| 3) Snap cap zkumavky | Eppendorf; Německo |
| 4) TSB | Sigma Aldrich; Německo |

- **Chemikálie pro ověření přítomnosti vyextrahované DNA**

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| 1) C-O primer mix | BioTech; Česká republika |
| 2) DNA free MiliQ | Qiagen; Německo |
| 3) Taq PCR Core Kit set | Qiagen; Německo. |
| 4) Izolovaná DNA | |

Sekvence primeru C-O mixu:

REC-5 : TGACCGCCGAGAAGAGCAA (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2000)

REC-3: CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2000)

- **Postup:**

Narostlé bakterie byly přeočkovány do snap-cap zkumavek s předplněnými 3 ml TSB bujonu. Bujon byl zvortexován a při 37°C ponechán přes noc na třepačce. Druhý den byl odebrán 1 ml čisté kultury do 1,5 ml zkumavky. Vzorky byly následně stáčeny po dobu 2 – 5 min při 13 000 rpm. Poté byl vylit supernatant a

sraženina byla resuspendována v 50 – 100 µl CHELEXu 100. Zkumavky se vzorky byly přeneseny do termobloku a inkubovány po dobu 5 minut. Pak byly ihned přeneseny na led a ponechány v lázni opět 5 minut. Proces inkubace v termobloku a v ledové lázni byl ještě jednou opakován. Potom byly zkumavky se vzorky centrifugovány po dobu 5 minut při 13 000 rpm. Získaný supernatant byl pomocí jednokolové PCR reakce zkontrolován, zda se opravdu jedná o kulturu *B. cepacia*.

Tabulka 3. Rozpis reakční směsi na PCR

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Množství na 1 vzorek
DNA free MiliQ	-	-	11,0 µl
PCR pufr	10×	1×	2,0 µl
MgCl ₂	25 mM	3 mM	0,4 µl
DNTP	10 mM každého	0,15 mM	0,4 µl
Primer C - O	20 mM	0,7 mM	0,7 µl
Q- roztok	5 ×	0,03 mM	4,0 µl
BSA	10 mg/ml	0,16mg/ml	0,32 µl
TAq polymeráza	5 U/µl	0,05 U/µl	0,16 µl
Vzorek DNA	-	-	1,0 µl
Celkový objem	-	-	20 µl

3.2.2 RAPD typizace

Metoda byla použita k prvoscreeingui genetické příbuznosti bakteriálních izolátů komplexu *B. cepacia*. Používaná DNA byla extrahována z kultur pomocí CHELEXu.

3.2.2.1 PCR

- **Chemikálie pro PCR:**

- 1) DNA free MiliQ Qiagen; Německo
- 2) Izolovaná DNA
- 3) Primer 270 FL EastPort; Česká republika

4) Taq PCR Core Kit set

Qiagen; Německo

Sekvence fluorescenčního primeru FL 270: TGCGCGCGGG-Cy5
(MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 1996a)

Cy-5: fluorescenčně značený cyaninový derivát

Tabulka 4. Rozpis reakční směsi

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Množství na 1 vzorek
DNA free MiliQ	-	-	13,5 µl
PCR pufr	10×	1×	2,5 µl
Q-roztok	5×	1×	5,0 µl
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1,5 µl
dNTP	10 mM každý	0,24 mM každý	0,6 µl
Fluorescenční primer	100 µM	1,6 µM	0,4 µl
Taq polymeráza	5 U/µl	1 U/µl	0,5 µl
Vzorek DNA	-	-	1,0 µl
Celkový objem	-	-	25 µl

• **Postup:**

Všechny chemikálie byly krátce zvortexovány a zcentrifugovány. Poté byla podle výše uvedeného rozpisu připravena reakční směs. Směs byla rozpipetována po 24 µl do jednotlivých pozic reakční PCR desky. Do každé jamky byl přidán 1 µl vzorku DNA z extrahované bakteriální kultury. Jako pozitivní kontrola byl použit bakteriální kmen X 123 (CCM 7292), 1232 (CCM 7291). Jako negativní kontrola byla použita voda. Deska byla umístěna do bloku termocycleru, který byl předehřátý na 94°C. Amplifikační program byl následující.

Amplifikační program: 1. 4 cykly:	94°C	5 min
	36°C	5 min
	72°C	5 min
2. 30cyklů:	94°C	1 min
	36°C	1 min
	72°C	2 min
3.	72°C	10 min

3.2.2.2 Kontrola produktu

Kontrola úspěšné amplifikace byla provedena pomocí horizontální elektroforézy v 2,5% agarózovém gelu.

• Chemikálie:

- | | |
|--|--------------------------|
| 1) Agaróza I | Amresco; USA |
| 2) Ethidium bromid (20mg/ml) | Sigma Aldrich; Německo |
| 3) Nanášecí pufr | Sigma Aldrich; Německo |
| 4) Velikostní marker 2-Log DNA Ladder | BioTech; Česká republika |
| 5) 0,5 × TBE pufr (Tris báze, kys. boritá
EDTA 0,5 M, pH 8, dest. H ₂ O) | |

• Postup:

Do jamek 2,5% agarózového gelu předbarveného EtBr v 0,5× TBE pufru byly naneseny vzorky smíšené s nanášecím pufr. K 5 µl PCR produktu bylo přidáno 5µl nanášecího pufru (40% sacharóza a bromfenolová modř). Zároveň byl připraven velikostní marker smíšením 5µl nanášecího pufru a 5µl 100bp velikostního markeru, který byl nanesen vždy do poslední pozice příslušné řady. PCR produkty byly rozděleny v 0,5×TBE pufru při napětí 6V/cm po dobu 45 minut. Gel byl zdokumentován fotografováním na UV transiluminátoru.

3.2.2.3 Identifikace produktů na polyakrylamidovém gelu

- **Přístroje a chemikálie :**

- 1) ALFexpress II DNA Sequence Analyzer APB; Švédsko
- 2) Denaturační barvička Sigma Aldrich; Německo
- 3) Long Ranger gel 3,75% BMA; USA
- 4) Ovládací software ALFwin Instrument Kontrol
Verze 2.00.15 APB; Švédsko
- 5) TEMED Sigma Aldrich; Německo
- 6) Velikostní marker AlfExpress Sizer 50-500 APB; Švédsko
- 7) Vyhodnocovací software ALFwin Fragment analyser
verze 1.00.35 APB; Švédsko
- 8) 10% persulfát amonný Sigma Aldrich; Německo
- 9) 7 M urea ICN; USA
- 10) 1× TBE pufr (pH 8,4)

- **Postup:**

Příprava vzorků:

Vzorky pro nanesení na gel byly připraveny následovně: do čistých stripů PCR zkumavek bylo předpipetováno 1,4 μ l vody, 3,5 μ l denaturační barvičky a 2,1 μ l vzorku. Poté byly vzorky denaturovány 4 minuty v předehřátém bloku termocycleru při 94°C. Denaturované vzorky byly ihned přeneseny do misky se směsí ledu a vody.

Příprava gelu a nanesení do přístroje:

Příprava gelu a nanesení vzorků do přístroje byly provedeny dle instrukcí výrobce. Gel byl připraven z 3,75% Long ranger gel, 7 M urey a 1× TBE pH 8,4. Před naleváním roztoku do připravené kazety (která se skládá z vodou temperovaného skla, krycího skla, 0,5 mm silných vymezovačů, hřebenu se 40 zuby a 8 svorek) bylo přidáno 400 μ l čerstvě připraveného 10% persulfátu amonný a 40 μ l TEMEDu. Roztok byl promíchán a pomocí injekční stříkačky aplikován do kazety. Pak byl zasunut hřeben a gel po dobu 2 hodin polymerizoval. Po polymerizaci byla kazeta vložena do přístroje Alfexpress a skla společně s pufrům temperována na teplotu 55°C. Vzorky i velikostní marker byly nanесeny po 4 μ l. Každou pozici bylo před nanесením vzorku nutné propláchnout pufrům z injekční stříkačky. Velikostní

marker byl na gel nanesen vždy alespoň do tří pozic. Nastavení vlastního běhu sekvenátoru bylo následující:

Voltáž: 1500 V

Napětí: 60 mA

Doba separace: 1500 min.

Teplota: 55°C

Signál byl zaznamenáván každé dvě sekundy.

- **Vyhodnocení výsledku**

Výsledek byl analyzován pomocí vyhodnocovacího software na fragmentovou analýzu. Porovnání jednotlivých profilů mezi sebou bylo prováděno vizuálně, kdy jednotlivé RAPD profily byly rozstříhány a vzájemně porovnány.

3.2.3 Detekce BCESM

Metoda byla použita k přímé detekci BCESM markeru pomocí PCR amplifikace.

- **Chemikálie pro PCR amplifikaci:**

1) DNA free MiliQ	Qiagen; Německo
2) dNTP (každý 5 mM)	Qiagen; Německo
3) Taq polymeráza	Qiagen; Německo
4) 10 ×PCR Pufř	Qiagen; Německo
5) 25 mM MgCl ₂	Qiagen; Německo
6) 20 μM primer mix BCESM	BioTech; Česká republika
7) 0,14 μM primer mix 16S	BioTech; Česká republika

Sekvence primerů pro BCESM:

BCESM 1 5- CCACGGACGTGACTAACA-3 (BALDWIN *et al.*, 2004)

BCESM 2 5- CGTCCATCCGAACACGAT-3 (BALDWIN *et al.*, 2004)

Sekvence primerů pro 16S rDNA:

UNI 2 GACTCCTACGGGAGGCAGCAG

UNI 5 CTGATCCGCGATTACTAGCGATTC

Tabulka 5. Rozpis reakční směsi

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Množství na 1 vzorek
DNA free MiliQ	-	-	8,4 µl
PCR pufr	10×	1×	2,0 µl
MgCl ₂	25 mM	3 mM	2,4 µl
dNTP	5 mM	0,15 mM	0,6 µl
Primer BCESM 1	20 mM	0,7 mM	0,7 µl
Primer BCESM 2	20 mM	0,7 mM	0,7 µl
Primer mix 16S	0,14 mM	0,03 mM	4,0 µl
Taq polymeráza	5 U/µl	0,05 U/µl	0,2 µl
Celkový objem	-	-	20 µl

• Postup:

Všechny chemikálie reakčního mixu byly zvortexovány a zcentrifugovány. Poté byl podle výše uvedeného rozpisu připraven reakční mix. Mix byl rozpipetován po 19 µl do jednotlivých pozic reakční desky. Byl přidán 1 µl extrahované DNA. Jako negativní kontrola byla použita voda a vzorek jenž nenáležel do genomvaru IIIA a bylo známo, že nenese BCESM. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek ET12. Deska byla umístěna do termocycleru a PCR amplifikace probíhala podle níže uvedeného amplifikčního programu.

Amplifikační program:	1.	94°C	5 min
	2. 30 cyklů:	94°C	30 sec
		60°C	30 sec
		72°C	90 sec
	3.	72°C	5 min

Kontrola úspěšné amplifikace byla provedena pomocí horizontální elektroforézy v 2,5% agarózového gelu (viz výše, odstavec 3.2.1.2 Kontrola produktu). PCR produkty byly rozděleny v 0,5×TBE pufru při napětí 6V/cm po dobu 30 minut. Gel byl zdokumentován fotografováním na UV transiluminátoru.

- **Vyhodnocení výsledku**

Vzorek pozitivní na přítomnost BCESM byl charakterizován proužkem v oblasti 1400 bp. Vzorek byl negativní na přítomnost BCESM, pokud neměl proužek v oblasti 1400 bp, ale měl proužek v oblasti cca 1100 bp, který představoval 16S rDNA, která byla použita jako vnitřní kontrola úspěšné amplifikace. Analýzu vzorku bylo nutné opakovat, pokud nebyl amplifikován ani jeden z fragmentů.

3.2.4 Detekce cblA genu

Metoda byla použita k přímé detekci cblA genu pomocí PCR amplifikace.

- **Chemikálie pro PCR amplifikaci:**

8) DNA free MiliQ	Qiagen; Německo
1) dNTP (každý 5 mM)	Qiagen; Německo
2) Taq polymeráza	Qiagen; Německo
3) 10 ×PCR Pufr	Qiagen; Německo
4) 25 mM MgCl ₂	Qiagen; Německo
5) 20 mM primer cblA 3	BioTech; Česká republika
6) 20 mM primer cblA 5	BioTech; Česká republika
7) 0,14 μM primer mix 16S	BioTech; Česká republika

Sekvence primerů pro cblA gen:

cblA 3 5-CCAAAGGACTAACCCA-3 (SAJJAN *et al.*, 1995)

cblA 5 5-ACGCGATGTCCATCACA-3 (SAJJAN *et al.*, 1995)

Tabulka 6. Rozpis reakční směsi

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Množství na 1 vzorek
PCR voda	-	-	8,4μl
PCR pufr	10×	1×	2,0μl
MgCl	25 mM	3 mM	2,4μl
dNTP	5 mM	0,15 mM	0,6μl
Primer cblA 3	20 mM	0,7 mM	0,7μl
Primer cblA 5	20 mM	0,7 mM	0,7μl
Primer mix 16S	0,25 mM	0,05 mM	4,0μl
TAq polymeráza	5U/μl	0,05U/μl	0,2μl
Celkový objem	-	-	20μl

• Postup:

Všechny chemikálie reakčního mixu byly zvortexovány a zcentrifugovány. Poté byl podle uvedeného rozpisu připraven reakční mix, který byl opět promíchán a zcentrifugován.

Mix byl rozpipetován po 19μl do jednotlivých pozic reakční desky. Byl přidán 1 μl extrahované DNA. Jako negativní kontrola byla použita voda a vzorek jenž nenáležel do genomvaru IIIA. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek ET12. Deska byla umístěna do termocycleru a PCR amplifikace probíhala podle níže uvedeného rozpisu.

Amplifikační program:

1. 94°C	5 min
2. 30 cyklů:	
94°C	30 sec
60°C	30 sec
72°C	60 sec
3. 72°C	2 min

Kontrola úspěšné amplifikace byla provedena pomocí horizontální elektroforézy v 2,5% agarózovém gelu (viz odstavec 3.2.1.2 Kontrola produktů). PCR produkty

byly rozděleny v 0,5×TBE pufru při napětí 6 V/cm po dobu 30 minut. Gel byl zdokumentován fotografováním na UV transiluminátoru.

- **Vyhodnocení výsledku**

Vzorek pozitivní na přítomnost BCESM byl charakterizován proužkem v oblasti 600 bp. Vzorek byl negativní pokud neměl proužek v oblasti 600 bp, ale měl proužek v oblasti cca 1100 bp, který představoval 16S rDNA, která byla použita jako vnitřní kontrola úspěšné amplifikace. Analýzu vzorku bylo nutné opakovat, pokud nebyl amplifikován ani jeden z fragmentů.

3.2.5 PFGE typizace

Metoda byla použita k ověření genetické příbuznosti bakteriálních izolátů komplexu *B. cenocepacia*.

- **Přístroje a pomůcky**

Centrifuga Mini spin plus	Eppendorf; Německo
Dokumentační systém	Polaroid; Velká Británie
Elektroforetická vana CHEF-DR2	Bio-Rad; Česká republika
Pipety	Eppendorf; Německo
	Finnpipette; Finsko
Spektrofotometr	BioTech; Česká republika
Termostat	Bio-Rad; Česká republika
Vodní lázeň	Bio-Rad; Česká republika

- **Spotřební materiál**

Bakteriologické jednorázové kličky	Medin; Česká republika
Buničina	Medin; Česká republika
Formičky na disky	Bio-Rad; Česká republika
Krycí sklíčka	Medin; Česká republika
Petriho misky	Gama group; Česká republika
Pipetování špičky s filtrem	Sarstedt; Německo
Spektrofotometrické kyvety	Eppendorf; Německo
Zkumavky 1,5ml	Sarstedt; Německo
Žiletky	Astra; Česká republika
15 ml kalibrované zkumavky	Sarstedt; Německo

- **Chemikálie a roztoky:**

- A. Chemikálie**

Agaróza SeaKem LE	FMC; Německo
BSA pufr	Biotech; Česká republika
Plug Sigma VII agaróza	Sigma Aldrich; Německo
Proteáza	Sigma Aldrich; Německo
Pulsed Field Certified Agarose	Bio-Rad; Česká republika
SpeI enzym	NE BioLabs; Česká republika
Velikostní marker	Bio-Rad; Česká republika
XbaI enzym	Biotech; Česká republika

- B. Roztoky:**

- PEN pufr**

50g NaOH
146g EDTA (ICN 800684)
10g N-lauroyl sarkosin (sodná sůl)
794 ml destilovaná voda
pH upraveno na 9,6

SE pufr

75 mM NaCl (4.38 g/l)

25 mM EDTA (50 ml 0.5M zásobního roztoku o pH 8.0)

pH upraveno na 7.4

10× TE pufr

10 ml 1 M Tris HCl pH 8,0

2 ml 0,5 M EDTA

988 ml destilovaná voda

- **Postup:**

A. Růst bakterií

Vzorky byly naočkovány ze zamrazené kultury nebo čerstvého vzorku na plotny s TSA agarem a inkubovány při 32°C po dobu 24 hodin.

B. Příprava disků

Bakteriologickou kličkou na jedno použití byly narostlé bakterie *Burkholderia cepacia* přeneseny do 1,5 ml zkumavky. Vzorky byly resuspendovány v 1000 µl SE pufru, tak že byly opakovaně intenzivně promíchány 200 µl pipetou. Poté byly vzorky centrifugovány 4 minuty při 5 000 rpm. Supernatant byl vylit a zkumavky byly krátce ponechány na buničině dnem vzhůru. Pak bylo ke vzorkům přidáno 1000 µl SE roztoku a pomocí pipety a vortexu opětovně třikrát až čtyřikrát resuspendovány. Poté byla masa bakteriální kultury adjustována na spektrometru při 600 nm kdy, do kyvety bylo předpipetováno 0,5 ml SE pufru a přidáno zhruba 60 µl bakteriální suspenze tak aby bylo dosaženo optické denzity 0,98 - 1,02.

Naředěná bakteriální kultura v množství 200 µl byla přepipetována do 1,5 µl mikrozkušavky. K těmto 200 µl kultury byla přidáno 200 µl 2% Sigma VII agarózy v SE pufru temperované na 45 - 50°C. Tato směs byla pipetou řádně promísena a nanášena do formiček na přípravu disků ve dvou kopiích. Disky se ponechaly deset minut tuhnout.

Ztuhlé disky byly přeneseny do 15 ml šroubovacích zkumavek, které byly předplněny 10 ml PEN roztoku s Proteázou o koncentraci 1 mg/ml na vzorek. Pak následovala inkubace ve vodní lázni při 37°C přes noc.

C. Štěpení bakteriálního chromozomu pomocí *SpeI* nebo *XbaI*

Druhý den byl odstraněn PEN pufr. Do jednotlivých zkumavek s disky bylo přidáno 10 ml TE pufru a inkubovány za stálého třepání 10 - 15 minut. Tento krok byl 3 - 4 opakován. Dostatečné promytí se projevovalo ulpíváním disků na stěně zkumavky.

Příprava disků na štěpení probíhalo tak, že jeden z disků byl vyjmut ze zkumavky na Petriho misku a pomocí žiletek byl z disku odříznut slabý proužek, který byl přenesen do směsi s restrikční endonukleázou.

Rozpis směsi s restrikční endonukleázou na 1 vzorek:	Spe I	1 ml
	Pufr 2	15 ml
	BSA	1,5 ml
	Voda	97,5 ml

Štěpení probíhalo přes noc při 37°C. Stejně tak byly inkubovány proužky velikostního markeru.

D. Pulzní elektroforéza

Separace fragmentů probíhala na 1% gelu SeaKem LE agarózy 0,5 × TBE pufru. Nejprve bylo připraveno 2,1 litru 0,5 × TBE. Z tohoto množství bylo 100 ml použito na rozpuštění 1 g agarózy. Hotová agaróza byla ponechána ve vodní lázni při 50°C.

Disky byly vyjmuty z směsi s restrikční endonukleázou a opatrně osušeny savým materiálem. Pak pomocí kličky a krycího sklíčka byly položeny na hřeben elektroforézy a ponechány cca 10 minut. Do první a poslední pozice hřebenu byl umístěn velikostní marker. Poté byl hřeben položen na formu gelu a zalit temperovanou agarózou. Jamky vzniklé po vyjmutí hřebenu byly zality uchovaným zbytkem agarózy. Gel byl po dokonalém zatuhnutí (cca 30min.) vyjmut z formy a vložen do elektroforetické vany.

Elektroforéza byla nastavena podle následujících parametrů:

Při štěpení *SpeI*:

Switch time: 30 - 70 sekund po dobu 10 hodin

30 - 90 sekund po dobu 14 hodin

Úhel: 120°

Voltáž: 5 V/cm

Teplota: 14°C

Při štěpení *XbaI*:

Switch time: 2 – 28 sekund po dobu 20 hodin

Úhel: 120°

Voltáž: 6 V/cm

Teplota: 14°C

Po uplynutí doby dělení byl gel barven v roztoku 100 ml TBE s přídavkem 1 μ l ethidium bromidu (koncentrace 1 μ l/ml) po dobu 20 minut a oplachován cca 5 minut ve vodě. Dokumentace výsledků byla prováděna pomocí fotografického přístroje Polaroid.

- **Vyhodnocení výsledku:**

Profily jednotlivých vzorků byly rozstříhány. Jejich velikost byla adjustována podle velikostního markeru, který byl separován na gelu společně se vzorky. Poté byl profil každého vzorku porovnán s profily ostatních vzorků.

4 Výsledky

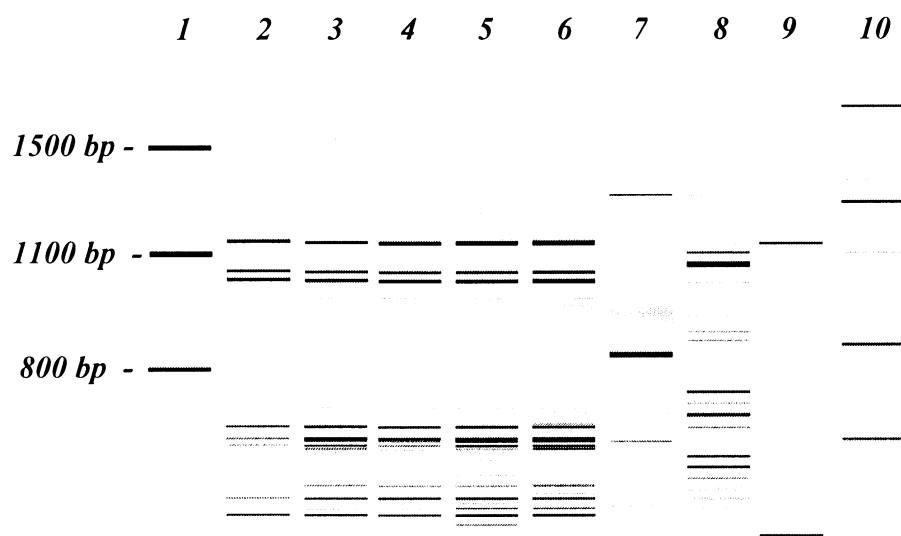
Soubor obsahující 83 izolátů *B. cenocepacia* ze sputa 67 pacientů s CF byl studován pomocí RAPD typizace, makrorestrikčního štěpení bakteriální DNA s následnou separací fragmentů v elektrickém pulzním poli a průkazu markerů epidemicity BCESM a cblA.

4.1 RAPD

Separace PCR produktů jednotlivých izolátů v polyakrylamidovém gelu vedla k rozlišení 10 – 25 proužků, jejichž velikost se pohybovala v rozmezí 200 – 1500 bp. Byly identifikovány 4 různé typy profilů. Z celkového počtu 83 izolátů jich 79 náleželo k jednomu typu RAPD profilu. Tato podobnost byla interpretována jako výraz klonální vazby těchto izolátů. Tento klon byl označen jako CZ1. Izoláty spadající do klonu CZ1 se navzájem ve svých RAPD profilech lišily maximálně ve třech proužcích. Ve čtyřech případech vzorky poskytovaly RAPD profily zcela odlišné od profilu CZ1 i od sebe navzájem. Tyto izoláty byly získány od různých pacientů s CF a byly označeny jako kmeny CZ2 – CZ4.

U šestnácti pacientů byly vyšetřeny dva vzorky. U patnácti z nich byla infekce v obou případech způsobena klonem CZ1. V jednom případě bylo zjištěno, že pacient byl původně infikován unikátním kmenem *B. cenocepacia* a následně došlo k infekci klonem CZ1.

Obrázek 2. Výsledek RAPD typizace *B. cenocepacia*. Pořadí izolátů je následující: v pozici 1 je nanesen velikostní marker; v pozici 2, 3 jsou vzorky RAPD 01 spadající do referenčního kmene C5635 a C6965, v pozicích 4-6 jsou naneseny izoláty českých pacientů s CF s majoritním klonem CZ1, v pozicích 7 – 9 jsou naneseny unikátní kmeny CZ2 – CZ4, v pozici 10 je izolát referenčního kmene ET 12 C5424.



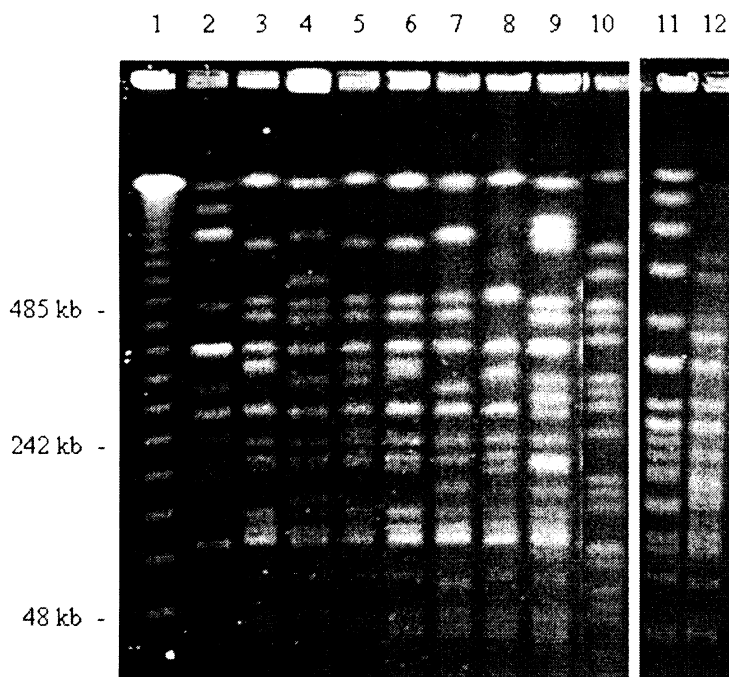
4.2 Makrorestrikční analýza

Štěpením pomocí restrikční endonukleázy *SpeI* a následným dělením vzniklých fragmentů v pulzním poli byly získány tzv. pulzotypy. Jeden pulzotyp obsahoval 15 – 20 proužků. Jednotlivé pulzotypy byly vizuálně vzájemně porovnány každý s každým a bylo zjištěno, že 77 izolátů má podobný pulzotyp.

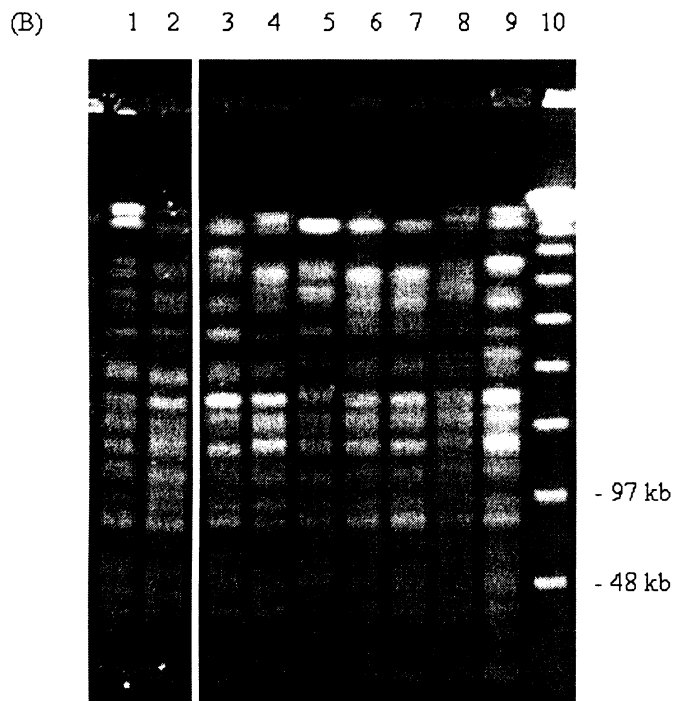
Makrorestrikčnímu štěpení pomocí *XbaI* bylo podrobena 62 izolátů. Jednotlivé fragmenty měly kratší délku než fragmenty vzniklé štěpením *SpeI*. Jejich maximální délka dosahovala 400 bp. Šest izolátů mělo unikátní *XbaI* pulzotyp. Těchto šest vzorků poskytovalo unikátní profil i po štěpení pomocí *SpeI*. Zbývající izoláty vykazovaly podobný motiv ve svém pulzotypu. Celková variabilita pulzotypů *XbaI* u zbývajících izolátů byla nižší než u pulzotypů *SpeI*. Určení podobnosti bylo komplikováno vysokým stupněm diverzity mezi jednotlivými profily. V několika případech se profily lišily až v šesti a více proužcích. Vzhledem k velkým

odlišnostem jednotlivých pulzotypů nebylo možné aplikovat tzv. Tenoverova kritéria pro úzce příbuzné kmeny. Kritéria pro interpretaci výsledku tedy byla modifikována tak, že nejprve byly porovnávány fragmenty o kratší délce (150 – 500 kb). Fragmenty v této oblasti byly rovnoměrně rozděleny, a přestože i zde se nacházely odlišnosti v jednom až třech prouzcích, bylo možné identifikovat podobný motiv jednotlivých pulzotypů. U izolátů s podobným motivem v oblasti kratších fragmentů byla porovnána oblast delších fragmentů (více než 600 kb). Při porovnávání této oblasti nebyla věnována pozornost těm prouzkům, u kterých byla patrná častá variabilita. Použitím modifikovaných kritérií pro hodnocení pulzotypů bylo 77 izolátů zařazeno k jednomu typu. Šest izolátů vykazovalo zcela odlišný pulzotyp od pulzotypu převládajícího klonu.

Obrázek 3. Příklad výsledku PFGE po štěpení *SpeI*. V pozici 1 je velikostní marker, v pozici 2 – 9 jsou naneseny izoláty českých pacientů s CF, které patří do dominantního klonu CZ1, v pozici 10 je profil unikátního kmene CZ3, v pozici 11-12 jsou referenční kmeny C5635 a C6965, spadající do kmene RAPD 01

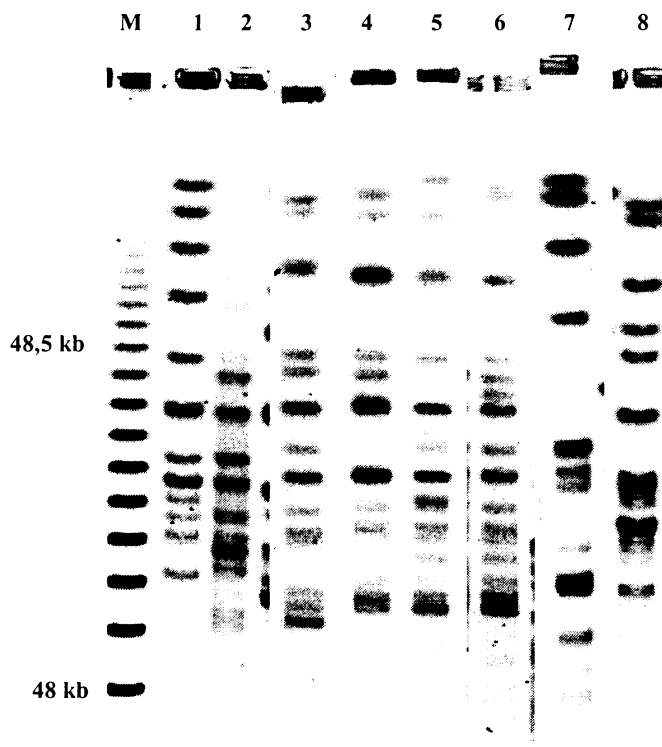


Obrázek 4. Ukázka výsledku PFGE po štěpení *XbaI*. V pozici 1-2 jsou referenční kmeny RAPD 01, v pozici 3-9 jsou izoláty majoritního klonu CZ1 a v pozici 10 je velikostní marker.



Obrázek 5. Ukázka porovnávání fingerprintových profilů získaných metodou PFGE (není-li k dispozici software pro hodnocení fingerprintů). V našem případě by vzhledem k velké variabilitě mezi jednotlivými profily, nemohl být daný software využit, protože by došlo k chybnému vyhodnocení.

Na obrázku jsou znázorněny profily osmi izolátů, které běžely na různých elektroforetických gelech. Po adjustaci jejich velikostí byl každý izolát srovnáván se všemi ostatními. Ve sloupcích 3 až 6 jsou zástupci epidemického klonu CZ1, kteří sdílejí stejný motiv, i když mezi profily můžeme nalézt rozdíly v šesti i více prouzcích. Ve sloupcích 1 a 2 je zachycen kanadský kmen RAPD typu 01, ve sloupci 8 epidemický kmen ET12. Klinický izolát s odlišným pulzotypem, než má kmen CZ 1, je pod číslem 7. Ve sloupci 1 je velikostní marker, který byl použit k adjustaci velikosti jednotlivých fragmentů.



4.3 Porovnání RAPD a PFGE

Výsledky RAPD metody i metody PFGE, kromě dvou případů, prokázaly příslušnost izolátů k majoritnímu klonu CZ1. Pomocí metody PFGE u zmíněných dvou izolátů nebyla příslušnost k CZ1 potvrzena, přestože RAPD profily odpovídaly klonu CZ1. U čtyř pacientů byly pomocí RAPD i PFGE identifikovány unikátní kmeny CZ2 – CZ4. Celkem 77 izolátů bylo pomocí obou molekulárně genetických metod zařazeno do dominantního epidemického klonu.

4.4 Detekce genu *cblA* a *BCESM*

Detekce epidemických markerů pomocí PCR technik byla provedena u 83 izolátů. Všechny izoláty byly negativní na přítomnost *cblA* genu. *BCESM* byl prokázán u 81 izolátů. Dva zbývající izoláty byly *BCESM* negativní. Tyto izoláty nenáležely do epidemického klonu CZ1, ale do kmene CZ3. Izoláty, patřící do epidemického klonu CZ1 a do kmenů CZ2 a CZ4 byly *BCESM* pozitivní.

4.5 Porovnání klonu CZ1 s ostatními známými epidemickými kmeny

Vzhledem k tomu, že v české populaci CF pacientů infikovaných *B. cenocepacia* se vyskytuje genomovar IIIA, který je *BCESM* pozitivní, bylo možné předem vyloučit příbuznost s kmenem označovaným jako PHDC, který představuje genomovar IIIB a je negativní na přítomnost obou markerů epidemicity.

Získaný profil obou fingerprintových technik převládajícího epidemického klonu CZ1 byl porovnán s profily popsanych epidemických kmenů. Tyto kmeny jsou podle svého RAPD profilu označovány jako RAPD 01, 02 (ET 12), 04 a 06 a náleží do genomovaru IIIA (SPEERT *et al.*, 2002). Porovnáním profilů bylo zjištěno, že fingerprintový profil se velmi podobá kanadskému epidemickému kmeni, který je v literatuře charakterizován profilem RAPD 01 a který zodpovídá za rozsev infekce především v CF centru v kanadském Vancouveru.

Zjištěním nepřítomnosti *cblA* genu u izolátů spadajících do CZ1, který se vyskytuje se v naší CF populaci, bylo možné vyloučit příbuznost s vysoce nebezpečným, epidemickým klonem ET12.

Tabulka 7. Rozdělení izolátů do jednotlivých genomovarů

Počet vzorků Metoda	Celkem	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4	Neidentifikováno
RAPD	83	79	1	2	1	-
PFGE <i>SpeI</i>	83	77	1	2	1	2
PFGE <i>XbaI</i>	62	56	1	2	1	2

Tabulka 8. Výsledky detekce markerů přenosnosti

Počet vzorků Marker	Celkem	Pozitivní	Negativní
<i>cblA</i>	83	0	81
BCESM	83	81	2

5 Diskuze

5.1 Epidemický kmen CZ1

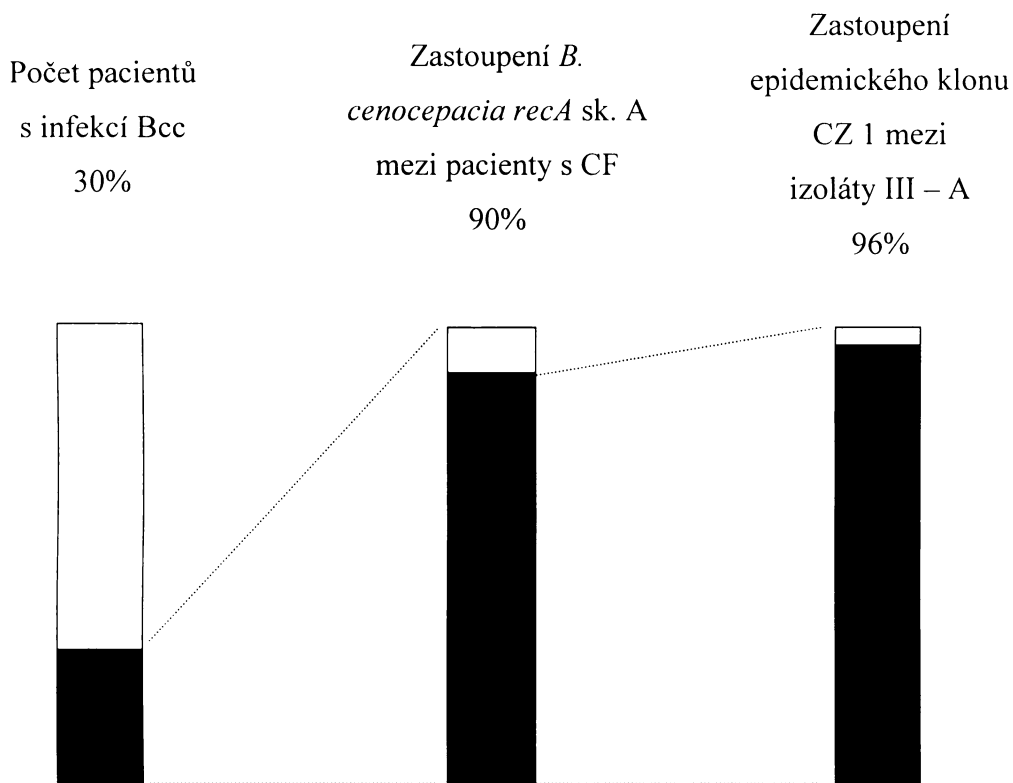
5.1.1 Nález nového epidemického kmene *B. cenocepacia*

Naše práce prokázala, že bakteriální populace komplexu *B. cepacia* je u českých pacientů s CF homogenní nejen na úrovni genomovaru (DREVINEK *et al.*, 2002), ale i na úrovni kmene.

Přítomnost epidemického kmene v populaci našich pacientů s CF naznačovaly některé nepřímé důkazy. V první řadě to byla vysoká prevalence. Pražské centrum pro léčbu CF má ve svém registru přibližně 30% pacientů kolonizovaných komplexem *B. cepacia*. Z literatury bylo známo, že vysokou prevalenci (až 50 %) udávají centra pro léčbu CF, kde byly identifikovány přenosné kmeny (centra v Torontu, Edinburghu nebo Manchesteru, kde byl identifikován ET 12, dále pak ve Philadelphii a Washingtonu, DC, kde se potýkají s PHDC). Po vzoru západních center pro léčbu CF, byla u pacientům infikovaných tímto patogenem, provedena identifikace jednotlivých genomovarů. Identifikace byla prováděna pomocí citlivých PCR reakcí, při kterých byly použity primery specifické pro jednotlivé genomovary. U devíti desetin pacientů byl identifikován genomovar III, *recA* skupina A, který je považován za nejrizikovější variantu Bcc (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2001).

Logickým pokračováním analýzy českých kmenů komplexu *B. cepacia* byla molekulární typizace. Jejím úkolem bylo zjistit, zda uvnitř genomovarově homogenní skupiny (tj. v rámci genomovaru *B. cenocepacia recA* skupiny A) je přítomen epidemický kmen či nikoliv. Klinické vzorky patřící do genomovaru III A byly podrobeny dvěma fingerprintovým technikám RAPD a makrorestrikčnímu štěpení s následnou separací fragmentů v pulzním poli. I přes interpretační úskalí výsledků PFGE jsme identifikovali epidemický klon sdílený většinou pacientů s infekcí *B. cenocepacia*. Znamená to, že vysoká prevalence infekce je dána rozsevem epidemického kmene v populaci pacientů nemocných CF (viz obrázek 5).

Obrázek 5. Struktura zastoupení původců infekce Bcc u českých pacientů s CF. Graf naznačuje vysoký stupeň uniformity uvnitř bakteriální populace.



5.1.2 Porovnání se známými epidemickými kmeny

Náš epidemický kmen CZ 1 je velmi podobný kanadskému epidemickému kmenu RAPD 01. Toto zjištění bylo překvapující, vzhledem ke značné vzdálenosti obou zemí a faktu, že tento kmen nebyl doposud nalezen v žádné zemi, která je Kanadě geograficky blíže. Určitá pravděpodobnost přenosu je dána kontaktem českých a kanadských pacientů s CF na mezinárodních táborech, pořádaných v 90. letech minulého století; jednoznačně dokumentovat takový kontakt již ovšem není možné. Je známo, že konání táborů úzce souvisí s přenosem a rozšířením infekce komplexem *B. cepacia* (GOVAN *et al.*, 1993; PEGUES *et al.*, 1994). Alternativním vysvětlením, jak mohlo dojít k rozšíření tak geograficky vzdáleného epidemického kmene, je přítomnost kmene v prostředí (půdě) jak v Kanadě, tak v naší zemi. Přenos z prostředí byl již popsán například u epidemického kmene PHDC (LIPUMA *et al.*, 2002), nikoli však v případě kmene RAPD 01.

Náš epidemický klon byl porovnán s dalšími publikovanými epidemickými kmeny ET 12, RAPD 04 a RAPD 06. RAPD i PFGE profil klonu CZ1 se od jejich profilů výrazně odlišoval. Nezvratný důkaz, že se však jedná o epidemický kmen, byl podán detekcí markeru přenosnosti BCESM, na který je CZ1 pozitivní. Naproti tomu nepřítomnost *cblA* genu u CZ1 definitivně vyloučila podobnost s ET 12 linií.

5.1.3 Situace v kanadských centrech pro léčbu CF

Situace v těchto centrech je poněkud odlišná. Prevalence infekce komplexem *B. cepacia* je v Kanadě taktéž vysoká (22%). Plných 83% případů infekce je způsobeno genomem III A. Pomocí molekulárně typizačních metod byla zjištěna distribuce jednotlivých epidemických kmenů v rámci genomu III *recA* skupiny A. Majoritním epidemickým kmenem v Kanadě je ET 12, který byl identifikován u 73% pacientů s CF infikovaných genomem III A. Epidemický kmen RAPD 01 je zde přítomen v mnohem menší míře než u nás (pouhých 4,6% infekcí). Tento fakt je zřejmě dán tím, že epidemický kmen ET 12 je mnohem virulentnější, agresivnější a přenosnější než jiné epidemické kmeny.

5.1.4 Příčiny rozsevu *B. cenocepacia*

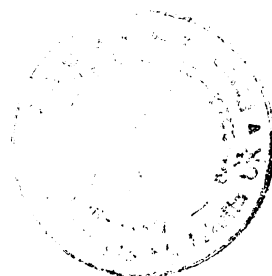
Rozšíření klonu CZ1 u velkého počtu pacientů je pravděpodobně způsobeno pozdním zahájením separačního systému v českých centrech pro léčbu CF a nedostatečnými protiepidemickými opatřeními. Mikrobiologická diagnostika patogenu založená pomocí kultivačních metod byla zavedena až v roce 1994, tedy v době, kdy západní centra CF již věděla o výskytu epidemických kmenů a reagovala na ně separací pacientů podle typu kolonizace. Striktní izolace nekolonizovaných pacientů od pacientů kolonizovaných komplexem *B. cepacia* byla zahájena v pražském centru v roce 1997. Toto rozdělení se ale později ukázalo jako nepřilíš šťastné. V rámci tohoto rozčlenění se setkávali pacienti s CF, kteří byli kolonizováni jak přenosným tak nepřenosným kmenem *B. cepacia*. Tímto opatřením se usnadnilo šíření přenosného kmene. Přenosná varianta kmene *B. cepacia* je ve své podstatě považována za více nepříznivou formu, která může vytěsnit nepřenosnou formu *B. cepacia* a svou vyšší virulencí zhoršit stav pacienta (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2001). Jak se podařilo zjistit, infekce epidemickým kmenem CZ1 alespoň u

jednoho pacienta nahradila infekci způsobenou unikátním kmenem. Stav z minulosti nám sice není znám, ale vzhledem ke značné genetické uniformitě klinických vzorků v celé české populaci pacientů s CF, lze předpokládat, že k podobné situaci došlo u většího počtu pacientů (pouze tři pacienti byly infikovány unikátním kmenem bakterie *B. cenocepacia*).

Na základě znalosti genomovaru a později i fingerprintového profilu kolonizující *B. cenocepacia* začal tým klinických pracovníků centra pro léčbu CF ve Fakultní nemocnici Motol aplikovat nová pravidla protiepidemického režimu. V současné době jsou separátně vedeny skupiny nemocných, kteří (i) mají epidemický klon CZ1 *B. cenocepacia*, (ii) mají *B. cenocepacia* jiného původu než CZ1, (iii) mají jiný genomvar než *B. cenocepacia* a (iv) vykazují pozitivitu na infekci Bcc pouze při použití citlivé metody PCR, nikoliv méně citlivé kultivace.

Separace pacientů s pozitivním PCR nálezem, ale negativním nálezem kultivačním. PCR vyšetření dává informaci současné nebo nedávné přítomnosti bakterie komplexu *B. cepacia* v dýchacích cestách – nicméně bakteriální izolát není k dispozici. Tato nejistota vede k tomu, že skupina PCR pozitivních a zároveň kultivačně negativních pacientů je vymezena jak vůči negativním pacientům, tak vůči pacientům kultivačně pozitivním.

Trend v incidenci infekce Bcc naznačuje, že nastolený protiepidemický systém bude efektivní. V roce 2004 byly diagnostikovány čtyři nové případy infekce *B. cepacia*. Tři z nich byly způsobené genomvarem III A. Při 30% prevalenci infekce lze považovat za úspěch, protože v dřívějších letech byl počet nově diagnostikovaných infekcí podstatně vyšší a převážná většina z nich byla způsobena genomvarem III A (viz. tabulka 9). Úspěšnost protiepidemického systému je podpořena i faktem, že v posledních letech se objevují mezi novými případy infekce Bcc zástupci jiných genomvarů, kteří nehrozí epidemickým šířením infekce. Pacienti je pravděpodobně získávají ze zevního prostředí a takovou cestu infikování nemůžeme hygienicko-epidemiologickým režimem ovlivnit.



Tabulka 9. Nově identifikované případy infekce Bcc (rozdělené podle jednotlivých genomovarů) v letech 1994 – 2004. Tabulka zahrnuje nově identifikované infekce Bcc u pacientů navštěvující pražské centrum pro léčbu CF. Identifikace byla prováděna pomocí PCR diagnostiky.

Rok	II	III-A	III-B	IV	Neurčen*	Počet pacientů
1995	0	11	0	0	3	14
1996	0	8	0	0	1	9
1997	0	4	0	0	1	5
1998	0	11	0	0	2	13
1999	0	10	0	0	1	11
2000	2	4	1	1	0	8
2001	0	4	1	0	0	5
2002	0	4	2	1	1	8
2003	0	0	1	0	0	1
2004	0	3	0	0	1	4
1994 –2004	2	56	5	2	9	78

*) Příslušnost bakterie ke genomovaru nebyla stanovena z důvodu neuchování izolátu pro PCR analýzu, negativního výsledku na všechny vyšetřované genomovarspecifické reakce nebo z důvodu, že infekce byla detekována pouze PCR metodou nikoli kultivačně.

5.1.5 Infekce Bcc u pacientů nemajících CF

Infekcí Bcc nejsou ohrožováni pouze pacienti s cystickou fibrózou. Jako oportunní patogen je *B. cepacia* detegována též u primárně či sekundárně imunokompromitovaných pacientů (non CF pacienti). Jen za období únor - červenec 2002 byla bakterie zachycena u 48 non CF pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Motol (především na odděleních Anesteziologicko-resuscitačním oddělení, novorozenecké Jednotce intenzivní péče, na plicní a gynekologicko-porodnické klinice). Nabízela se logická otázka, zda existuje epidemiologická souvislost mezi těmito izoláty a kmeny, které infikují CF pacienti. Vyšetření

jednotlivých vzorků na typ genomovaru prokázalo, že mezi CF populací a pacienty s jinými diagnózami „necirkuluje“ tatáž bakterie. Zatímco pacienti s CF jsou osídleni především bakteriemi genomovaru IIIA, u non CF nemocných převládal nález genomovaru IV.

5.4 Metodické aspekty

5.1.6 RAPD

Metoda RAPD byla primárně vybrána pro svou jednoduchost provedení a uspokojivou rozlišovací schopnost. Většina vzorků vykazovala shodný profil na RAPD. Zvolili jsme detekci založenou na scanování fluorescenčně značených RAPD fragmentů. Díky využití fluorescenčního značení fragmentů jsme docílili vyšší rozlišovací schopnosti a tím většího počtu proužků v rámci jednotlivých profilů. Pomocí počítačového programu bylo možné provést detailnější hodnocení nascanovaných proužků, kdy jsme posuzovali jak jejich intenzitu, tak přesnou polohu. Taktéž bylo možné porovnávat pouze určité úseky profilů. Tato metoda také vykazovala vysokou reprodukcibilitu, která byla demonstrována tak, že jsme opakovaně za stejných podmínek analyzovali stejné vzorky ve stejném přístroji a získané profily daných vzorků byly shodné. Přestože RAPD výsledky potvrdily naši domněnku, že v české CF populaci je přítomen převládající epidemický kmen, chtěli jsme potvrdit tyto výsledky další molekulárně typizační metodou.

5.1.7 Makrorestrikční štěpení *SpeI*, *XbaI* a PFGE

Tato metoda, i přes svoji časovou náročnost, je označována jako zlatý standard fingerprintových technik pro svoji vynikající reprodukovatelnost, rozlišovací účinnost a definovaná kritéria pro interpretaci výsledku. Na rozdíl od RAPD metody, kdy jsme získali jednotný RAPD profil převládajícího klonu, pulzotypy analyzovaných izolátů byly odlišné až v osmi proužcích. Původně jsme se domnívali, že vysoká variabilita jednotlivých profilů může být zapříčiněna volbou restriktivního enzymu *SpeI*. Proto byly vzorky analyzovány znovu, tentokrát pomocí restriktivní endonukleázy *XbaI*. Výsledek byl ale podobný jako v případě *SpeI*.

K vyhodnocení výsledků PFGE separace se využívá Tenoverových pravidel,

kteřá říkají, že za úzce příbuzné lze označit takové izoláty, jejichž profily se odlišují v jednom až třech prouzcích (TENOVER *et al.*, 1995). Pokud by tedy hodnocení probíhalo přesně podle Tenoverových pravidel, nemohli bychom potvrdit přítomnost epidemického kmene v české CF populaci. Jak bylo později zjištěno a potvrzeno, Tenoverova pravidla je možné úspěšně aplikovat pouze na skupinu vzorků, která byla sesbírána v rámci jednoho outbreaku např. při studiu bakterie *Staphylococcus aureus* (MCDUGAL *et al.*, 2003). Pokud však analyzujeme vzorky, které byly shromážděny během delšího časového období, je zde možnost vzniku náhodných mutací v rámci celého bakteriálního genomu. Díky těmto mutacím pak epidemiologicky příbuzné izoláty mohou vykazovat odlišnosti ve svém pulzotypu. V případě *B. cenocepacia* je pravděpodobnost vzniku náhodných mutací zesílena přítomností multireplikonového genomu s velkým počtem inzerčních sekvencí.

Vzhledem k tomu, že jednotlivé profily vykazovaly značnou heterogenitu jak v kvalitě obrazu tak samotném fingerprintu, nebyly výsledky vyhodnocovány pomocí počítačové analýzy. Počítačové zpracování by pravděpodobně vedlo k zavádějícímu třídění našich vzorků. Jednotlivé pulzotypy tedy byly porovnány vizuálně. Během vizuálního hodnocení byly jednotlivé profily porovnávány mezi sebou. I během tohoto vyhodnocování vznikly problémy způsobené odlišnou kvalitou profilů jednotlivých izolátů, které byly rozdělovány na různých gelech. Další komplikace byla dána nutností adjustovat každý profil podle žebříčku příslušného gelu. Výsledky PFGE se ve většině shodovaly s výsledky RAPD analýzy. Rozpor nastal pouze ve dvou případech, kdy vzorky vykazovaly unikátní PFGE profil, ale RAPD profil byl shodný s profilem převládajícího epidemického kmene. Unikátní profil vykazovaly tyto dva vzorky jak při štěpení *SpeI* tak *XbaI*. Tato odchylka může být způsobena výraznou rozlišovací silou, která může vést k falešné neshodě v případě dvou izolátů.

Celková vysoká shoda výsledků obou analýz ukazuje, že méně pracná a časově méně náročná RAPD analýza je spolehlivým měřítkem pro první analýzu rozsáhlé kolekce vzorků. Naproti tomu mimořádná rozlišovací síla PFGE může způsobit riziko falešného označení některých vzorků jako nepříbuzné. Jako příklad lze uvést dvojice vzorků od sedmi pacientů, které byly izolovány v časovém odstupu minimálně půl roku. Tyto vzorky vykazovaly shodný RAPD profil, ale PFGE profily po makrorestrikčním štěpení se vzájemně lišily až v osmi prouzcích. Naše poznatky s analýzou PFGE pro větší sbírku vzorků nashromážděných během delšího časového

období se shodují se studií, která porovnávala vhodnost jednotlivých genotypizačních metod pro studium *B. cepacia* (COENYE *et al.*, 2002). V této práci autoři navrhují jako vhodné měřítko pro studium širších a delších epidemiologických studií metodu BOX – PCR.

6 Závěr

Infekce bakteriemi komplexu *B. cepacia* je velmi závažný faktor ovlivňující zdravotní stav pacientů s cystickou fibrózou. U většiny nemocných infekce nepříznivě ovlivňuje celkovou prognózu onemocnění. Ke sledování cest přenosu infekce mezi jednotlivými nemocnými byly využity fingerprintingové metody, které dokáží určit konkrétní původ určité zjištěné bakterie.

Analýzou výsledků pražského centra pro léčbu cystické fibrózy bylo prokázáno, že v našich podmínkách byl hlavním důvodem rozšíření infekce, způsobené epidemickým kmenem CZ 1, přenos mezi jednotlivými pacienty. V tom je situace zřejmě odlišná proti některým jiným zemím, kde v minulosti nedocházelo k tak intenzivnímu pořádání rehabilitačních a rekondičních pobytů, jako tomu bylo v Československu a později v České republice. Tyto aktivity se bohužel později ukázaly jako významný epidemiologický rizikový faktor, který usnadnil rozšíření epidemického kmene CZ 1 v populaci pacientů s cystickou fibrózou. Jedním z výstupů naší práce jsou preventivní opatření v rámci péče o nemocné CF, která by měla vést ke snížení rizika získání závažné bakteriální infekce. První výsledky klinické analýzy dokazují, že od doby, kdy došlo k zpřísnění a důslednějšímu dodržování protiepidemiologických opatření, je možné pozorovat určité zlepšení v incidenci infekce i v závažnosti jejího dopadu na stav nemocných CF.

Jak už zde ale bylo zmíněno, pacienty s cystickou fibrózou neohrožují pouze bakterie komplexu *B. cepacia*. Za vysoké procento infekcí je zodpovědná *Pseudomonas aeruginosa*, a předmětem zájmu odborníků se stále více stává *Stenotrophomonas maltophilia*. Hygienicko-epidemiologický režim by tedy neměl být zaměřen pouze proti bakteriím komplexu *B. cepacia*, ale také proti dalším patogenům, u kterých zatím neznáme pozadí infekce ve smyslu jejího možného epidemického šíření.

Objektivní a přesné informace o mikrobiální kolonizaci nemocných CF jsou základním předpokladem úspěšné komplexní péče o nemocné CF. Jen péče založená na včasné a přesné identifikaci závažných patogenních mikrobů, řízená dále podle funkčních parametrů, podle pravidelného sledování stavu výživy spolu s jeho aktivním ovlivňováním a s uplatněním všech moderních postupů je jedinou cestou k ovlivnění prognózy této dosud nevyléčitelné závažné nemoci.

7 Přílohy – publikované práce

7.1 původní článek

Journal of Medical Microbiology (2005), 54, 1–5

DOI 10.1099/jmm.0.46025-0

Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic

Pavel Drevinek,^{1,2} Sarka Vosahlikova,¹ Ondrej Cinek,¹ Vera Vavrova,¹ Jana Bartosova,¹ Petr Pohunek¹ and Eshwar Mahenthiralingam²

Correspondence

Pavel Drevinek
DrevinekP@Cardiff.ac.uk

¹Paediatric Department, Charles University 2nd Medical School, Prague, Czech Republic

²Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Main Building, Museum Avenue, PO Box 915, Cardiff, Wales, UK

The morbidity and mortality rates in patients with cystic fibrosis (CF) are significantly affected by infections with *Burkholderia cepacia* complex. In a Czech CF Centre, the prevalence of the infection reached up to 30 %, with the majority of patients found to be infected with *Burkholderia cenocepacia* (formerly genomovar III of the *Burkholderia cepacia* complex). Since *B. cenocepacia* is associated with patient-to-patient transmission and epidemic outbreaks among CF patients, this study sought to examine the epidemiological relatedness between the Czech isolates belonging to the genomovar-homogeneous group. Eighty-three clinical isolates recovered from 67 CF patients were analysed using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and macrorestriction typing (*SpeI* and *XbaI*) followed by PFGE. A single predominant banding pattern shared by multiple isolates was detected, although *SpeI*-generated PFGE results yielded a higher rate of inter-pattern variability in comparison to the more uniform RAPD and *XbaI*-generated PFGE results for this clone. Both typing systems also showed that only three out of 67 patients harboured strains distinct from the major strain type. The dominant clone was characterized by PCR positivity for the *B. cepacia* epidemic strain marker, PCR negativity for the cable pilin subunit gene and close genetic relatedness to the epidemic strain of RAPD 01 type previously identified in Canada.

Received 27 January 2005

Accepted 4 April 2005

INTRODUCTION

Infections with micro-organisms from the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) are highly problematic for patients with cystic fibrosis (CF). These infections represent burdens not only for individual infected patients but also for the CF community as a whole since certain Bcc strains have the capacity of patient-to-patient transmission (Mahenthiralingam *et al.*, 2002).

Most transmissible strains have been identified within the recently designated species *Burkholderia cenocepacia* (genomovar III of the Bcc) (Vandamme *et al.*, 2003). For example, strains from the cable-pilus-encoding ET12 lineage have been responsible for epidemic outbreaks in a Toronto CF centre, and subsequently were spread to the UK (Johnson *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1995). Other transmissible strains within *B. cenocepacia* but distinct from the ET12 lineage have been identified in Canada (strain types designated RAPD 01, 04 and 06 (Speert *et al.*, 2002); belonging to *recA*-derived subgroup IIIA) and in the USA (PHDC strain (Chen *et al.*,

2001) and Midwest clone (LiPuma *et al.*, 1988); belonging to *recA* group IIIB]. Recently published data on PHDC and its presence in Europe indicate that transatlantic spread of the Bcc is not a feature exclusive to the ET12 lineage (Coenye *et al.*, 2004).

The Czech CF community represents a CF population with high Bcc prevalence, reaching up to 30 % during the late 1990s (P. Drevinek, unpublished data). Such a high figure may indicate that transmissible strains of the Bcc are present within the patient population. This assumption was further emphasized by assignment of more than 90 % of isolates into the *B. cenocepacia recA* IIIA category (Drevinek *et al.*, 2003). However, to reveal the true epidemic origin of the infection, further analysis of the genomovar-homogeneous groups was necessary.

In this study, we performed random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis (Mahenthiralingam *et al.*, 1996) and macrorestriction typing followed by PFGE (Mahenthiralingam *et al.*, 2001) to investigate genetic relatedness between Czech clinical isolates and to compare them with major epidemic strains from other CF centres. In addition, the isolates were also screened for the presence of genetic markers of strain transmissibility, i.e. the *B. cepacia* epidemic strain

Abbreviations: Bcc, *Burkholderia cepacia* complex; BCESM, *B. cepacia* epidemic strain marker; CF, cystic fibrosis; RAPD, random amplified polymorphic DNA.

marker (BCESM) (Mahenthalingam *et al.*, 1997), a common genetic marker present in several well-described *B. cenocepacia* epidemic strains, and the *cbIA* gene (Sajjan *et al.*, 1995) specific for the ET12 strain.

METHODS

Patients and bacterial strains. Over the period 1997–2003, a total of 83 *B. cenocepacia* clinical isolates recovered from 67 CF patients had been stored. These 67 patients (34 males, 33 females; age 9–31 years) represented the majority (94%) of Bcc-infected patients attending the Prague CF Centre. Single isolates were archived from 51 CF patients and two serial isolates recovered with a mean time interval of 38 months (range 22–54 months) were available from sixteen additional patients.

To check the accuracy of culture-based identification and to determine the genomovar status of the Bcc, extracted DNA from each isolate was subject to generic and genomovar-specific PCRs as described previously (Drevinek *et al.*, 2002). All the isolates were assigned to *B. cenocepacia*, *recA* group IIIA. For further comparative analyses, the *B. cenocepacia* strains of several epidemic lineages were included in the analysis (Speert *et al.*, 2002): C5635 and C6965 (RAPD type 01 strains), C5424 and J2315 (RAPD type 02, ET12 lineage), C5726 and C6433 (RAPD type 04), and C8182 and C7748 (RAPD type 06).

RAPD typing. For PCR-based typing, bacterial DNA was extracted from fresh overnight cultures using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen). RAPD assays were performed according to a previously described protocol (Mahenthalingam *et al.*, 1996) with slight modifications based on the use of a fluorescently tagged (Cy-5) primer 270 that enabled visualization of the amplification products on an ALFexpress II DNA sequence analyser (Pharmacia). The fragments were separated in 3.75% Long Ranger gels (BMA) with 7 M urea and 1× TBE buffer (pH 8.4) at 55 °C and 1500 V for 10 h. In-house-made PCR fragments of 800, 1100 and 1500 bp in length were used as molecular size standards. Banding patterns were compared visually.

PFGE typing. Prior to processing for PFGE, bacterial cultures were grown in Tryptone soya broth with shaking (200 r.p.m.) at 37 °C overnight. The density of harvested bacteria was adjusted to OD₆₂₀ 0.8–0.9 and thereafter culture cells were embedded in plugs with low gelling temperature agarose type VII (Sigma). The plugs were lysed overnight with 1% *N*-lauroyl sarcosine sodium salt and 0.1% Pronase (Roche). Macrorestriction of genomic DNA was performed using either 3 U of *SpeI* or 2.5 U of *XbaI* enzymes at 37 °C overnight. Fragments were separated on a 1.2% agarose gel with 0.5× TBE running buffer at 14 °C and 6 V cm⁻¹ on a CHEF-DR2 device (Bio-Rad). For *SpeI*-digested DNA, PFGE conditions were as follows: 1 to 40 s for 10 h and 30 to 90 s for 14 h. *XbaI*-digested DNA was separated under the ramp conditions of 2 to 28 s for 20 h. A lambda ladder was used as a standard size marker. Banding patterns were compared visually and defined criteria (Tenover *et al.*, 1995) were used to determine the pulsotype of each isolate.

Epidemic strain-specific PCR. PCR assays targeting two markers of transmissibility, *cbIA* and BCESM, were performed in accordance with published protocols (Sajjan *et al.*, 1995; Mahenthalingam *et al.*, 1997). In addition, PCR detecting eubacterial 16S rDNA sequence was included in each PCR reaction as an internal control of successful amplification (primers published by Mahenthalingam *et al.*, 2000).

RESULTS AND DISCUSSION

The high prevalence of *B. cenocepacia*-infected patients present in the Czech CF community was a cogent reason for performing active surveillance using genotyping meth-

ods. To assess the genetic relationship between *B. cenocepacia* isolates, two widely used fingerprinting techniques were applied. RAPD typing was primarily chosen for its unquestionable advantage of ease of performance and its expected satisfactory discriminatory power when analysing large populations of micro-organisms collected over extended periods of time. A higher discriminatory power can be achieved by PFGE analysis, which also disposes excellent reproducibility with narrow inter-gel variability (Coenye *et al.*, 2002; Tenover *et al.*, 1995). Therefore, PFGE as a gold standard of bacteriological typing was used to check the propriety of the RAPD results and of their interpretation.

RAPD of *B. cenocepacia* isolates

Separation of fluorescently labelled RAPD products in an acrylamide gel, which was scanned by an ALFexpress II sequencer, led to clear distinction of between 10 and 25 bands over a size range of 200 to 1500 bp for each Bcc isolate examined. Excellent reproducibility of banding patterns with only minor variations in particular band intensities was demonstrated when applied to the same samples on repeated occasions.

A total of four RAPD types were identified among the 67 CF patients studied. Seventy-nine of the 83 isolates analysed showed a single dominant RAPD typing pattern, designated type 1 (Fig. 1). The RAPD patterns of four isolates, each recovered from a different CF patient, were distinct from the type 1 pattern and represented different types (types 2–4; type 3 was found in two of these four isolates).

One CF patient, originally infected with a unique strain, was subsequently superinfected with a strain of RAPD type 1 when examined 2 years later. The remaining 15 patients for

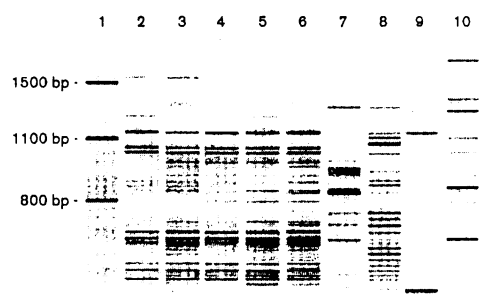


Fig. 1. RAPD typing of *B. cenocepacia*. RAPD-generated polymorphisms are displayed as a graphical output from the sequence analyser. Samples in each lane are as follows: 1, molecular size markers; 2 and 3, RAPD type 01 reference strains C5635 and C6965, respectively; 4–6, Czech CF patient isolates of the dominant clone CZ1; 7–9, unique Czech strains CZ2, CZ3 and CZ4, respectively; 10, ET12 reference strain C5424.

the multireplicon genome of *B. cenocepacia* that harbours a high-copy-number of insertion-sequence elements (Lessie *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2003). Their presence in the dominant clone CZ1 may have promoted genomic rearrangements that were detected by macrorestriction with *SpeI*, but not observed by either *XbaI* analysis or RAPD typing.

Overall high concordance between PFGE and RAPD results showed that the less laborious RAPD analysis was a reliable tool for the first screening of our large isolate collection, corroborating the results observed in other studies that have used this technique to type *Pseudomonas aeruginosa* (Mahenthiralingam *et al.*, 1996). In contrast, the excessively high discriminatory power of PFGE (specifically with *SpeI*) conferred the risk that isolates belonging to a common lineage but recovered over extended periods of time would be deemed unrelated. This oversensitivity of PFGE might be a reason for the discrepancies observed in two clinical samples, which were assigned to the unique strain group by PFGE, while RAPD analysis revealed no major differences between their patterns and the pattern of the dominant clone. Our experience with PFGE for the analysis of larger sets of *B. cenocepacia* isolates is in agreement with a comparative study of *B. cenocepacia* genotyping methods (Coenye *et al.*, 2002). In this study, the authors proposed BOX-PCR fingerprinting as a more appropriate molecular tool for global epidemiological studies.

***CblA* and BCESM detection**

The clone CZ1, shared by multiple Czech CF patients, and the CZ4 strain were PCR positive for the auxiliary marker of transmissible *B. cenocepacia* strains (BCESM), but PCR negative for the genetic indicator of the ET12 strain (*cblA*). Strains CZ2 and CZ3 were both BCESM- and *cblA*-negative.

Comparison of the clone CZ1 with other epidemic strains

Based on characteristics of the other epidemic strains, we compared the Czech clone CZ1 with Canadian epidemic strains of RAPD 01, 04 and 06 types (Speert *et al.*, 2002) as well as with the ET12 lineage, since the *cblA*-negative ET12 strain has been recently observed (McDowell *et al.*, 2004). Close similarity between CZ1 and Canadian RAPD 01 was detected by both fingerprinting systems (RAPD and PFGE data are shown in Figs 1 and 2, respectively). Examination of clone CZ1 and the Canadian RAPD type as part of a Bcc multilocus sequencing typing scheme has also demonstrated that they are the same strain type (A. Baldwin, C. Dowson, E. Mahenthiralingam, unpublished data). This was a rather surprising finding. It is certainly possible that social contact between Czech and Canadian CF patients during the early 1990s may have occurred as a result of international CF camps held at that time. Attendance of CF camps has been linked to the spread of Bcc infection (Govan *et al.*, 1993; Pegues *et al.*, 1994); however, no direct epidemiological link between Czech and Canadian patients was found in the records available at our centre. An alternative explanation for

the prevalence of a single strain type may lie in the occurrence of the strain in the proximate environment of CF patients acting as a primary source of the infection. The isolation of the epidemic PHDC strain in soil serves as a precedent for the existence of epidemic strains in natural niches (LiPuma *et al.*, 2002).

Infection control in Bcc-positive patients

A strict isolation policy of cohorting Bcc-infected patients aimed at preventing further spread of *B. cenocepacia* infection among patients of the Prague CF Centre was introduced in 1997. However, keeping patients colonized with Bcc apart from the others has turned out to be an inadequate control measure. This measure does not reflect a risk of strain replacement with epidemic clones within the group of Bcc-infected patients, which is considered an unfavourable phenomenon because a transmissible strain is likely to be more virulent than a non-transmissible one (Mahenthiralingam *et al.*, 2001; Speert *et al.*, 2002). As documented in this study, the epidemic clone CZ1 had replaced a unique strain in at least one patient since 1997. We can speculate that more patients may have suffered from such superinfection events in the past, since genetic uniformity of clinical isolates throughout the Czech CF population was very high (only three out of 67 patients harboured unique strains).

It is therefore highly advisable to include the epidemic status of isolates into rational cross-infection control guidelines and to segregate patients infected with epidemic strains of *B. cenocepacia* from those infected with sporadic unique strains. Although many CF centres practice individual segregation of patients as a means of infection control (Saiman & Siegel, 2003), this practice is difficult in clinics where resources and space are limited. Hence, understanding the risk posed by the epidemic strains can still be useful for implementing infection control policies in centres that experience such problems. It is worth noting that identification of transmissible strains should be based on genotyping methods and not be confined to markers of transmissibility as they are not absolute markers for epidemic strains (Chen *et al.*, 2001; McDowell *et al.*, 2004). Lack of these markers for definitive identification was also indicated during our study where one sporadic isolate with a unique banding profile (*i.e.* CZ4) yielded a BCESM-positive result, but demonstrated no evidence of spread between patients.

In summary, we have identified a BCESM-positive *cblA*-negative epidemic clone that has been responsible for the spread of *B. cenocepacia* infection among Czech patients with CF. The clone, which is genetically closely related to the Canadian epidemic strain of RAPD 01 type found in multiple patients from British Columbia, Alberta and Quebec provinces, might be, in addition to the ET12 strain and the recently described PHDC second transatlantic clone (Coenye *et al.*, 2004), another representative of an intercontinental epidemic lineage. Two isolates of the clone CZ1 have been deposited in the Czech Collection of Microorganisms (CCM7291 and CCM7292).

whom serial specimens were available were all infected with strains of the same RAPD pattern (i.e. type 1) at both sampling points.

PFGE of *B. cenocepacia* isolates

Although RAPD results were indicative for the occurrence of a major *B. cenocepacia* transmissible strain within the Czech CF population, we sought concordance of our findings with an additional molecular typing method before drawing conclusions (Goering, 2004). Therefore, all isolates were subjected to *SpeI* enzyme restriction followed by PFGE, which generated bands up to 1 Mb in size, and the fingerprints obtained were compared visually. Comparing each of the banding patterns with all the others, in total 77 out of 83 isolates yielded similar banding patterns. However, the comparison was complicated by a relatively high diversity between individual patterns, reaching up to eight fragment differences in several cases. The relative degree of similarity was validated with respect to isolates sharing banding motifs at the lower size range of macrorestriction fragments where bands were well separated (150–500 kb), and by ignoring the most frequently observed variability in larger fragments (above 600 kb). When these modified criteria were applied, six out of 83 isolates had patterns significantly different from the predominant one. An illustration of PFGE fingerprint variability detected within isolates of the dominant type is shown in Fig. 2(a); dissimilarity among patterns is shown even comparing two isolates recovered in a 3-year interval from a single patient (lanes 2 and 3). Owing to a number of band differences, computer-assisted analyses predicted low similarity values and misleading clustering of isolates (data not shown).

XbaI-based macrorestriction typing was primarily performed as an additional method for 62 isolates to evaluate the significance of *SpeI*-digested fragment diversity. Smaller macrorestriction fragments with a maximum size of 400 kb were derived from this analysis. Six isolates differed in their profiles from the major *XbaI*-generated pulsotype, each of which corresponded to one of the six isolates of unique *SpeI* types detected. Significantly less variation was seen in isolates representative of the dominant RAPD type where considerable variation in *SpeI* fingerprints had been observed (56 out of 62 isolates examined by *XbaI*; see Fig. 2b).

Comparison of RAPD vs PFGE results

The results of RAPD fingerprinting corresponded to those of PFGE for all but two clinical isolates. Seventy-seven of 83 isolates were shown to be closely related by both typing methods and designated the dominant clonal type CZ1; other strains were designated CZ2, CZ3 and CZ4, corresponding to RAPD types 2, 3 and 4, respectively. The shared consensual *SpeI*-generated pulsotype of CZ1 showed higher inter-pattern divergence compared to the uniform predominant RAPD pattern. Hence, the indicative value of PFGE for detecting epidemic strains conflicts with the only reported criteria for visual PFGE interpretation (Tenover *et al.*, 1995). Nevertheless, these Tenover rules were set up for analysis of a small set of samples that were related to a single epidemic outbreak. They are not appropriate for large-scale studies (Goering, 2004; Tenover *et al.*, 1995) when more random mutation events can be expected throughout a bacterial genome over a study period and even epidemiologically related isolates may express more pattern heterogeneity. Moreover, a higher mutation rate is likely to occur in

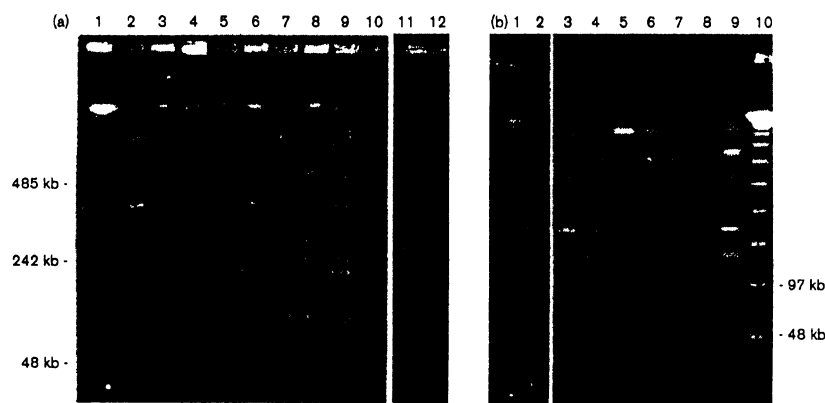


Fig. 2. PFGE of (a) *SpeI*-digested and (b) *XbaI*-digested genomes of *B. cenocepacia*. (a) Samples in each lane: 1, molecular size marker (lambda concatamer); 2–9, Czech CF patient isolates of the clone CZ1; 10, unique Czech strain CZ3; 11 and 12, RAPD type 01 reference strains C5635 and C6965, respectively. (b) Samples in each lane: 1 and 2, RAPD type 01 reference strains C5635 and C6965, respectively; 3–9, patient isolates of the clone CZ1; 10, molecular size marker. Both parts of composite gels were matched to appropriate size using molecular size markers as a standard.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank John J. LiPuma (University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA) and Alexandr Nemeč (National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic) for helpful discussions. The excellent technical assistance of Helena Reitzova and Josef Vcelak is gratefully acknowledged. This study was supported by Ministry of Education, Czech Republic (MSM 0021620812). P. D. acknowledges Wellcome Trust for Travel Award funding his short-term visit to Cardiff School of Biosciences.

REFERENCES

- Chen, J. S., Witzmann, K. A., Spilker, T., Fink, R. J. & LiPuma, J. J. (2001). Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. *J Pediatr* 139, 643–649.
- Coenye, T., Spilker, T., Martin, A. & LiPuma, J. J. (2002). Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* genomovar III. *J Clin Microbiol* 40, 3300–3307.
- Coenye, T., Spilker, T., Van Schoor, A., LiPuma, J. J. & Vandamme, P. (2004). Recovery of *Burkholderia cenocepacia* strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. *Thorax* 59, 952–954.
- Drevinek, P., Hrbáčková, H., Cinek, O., Bartosova, J., Nyc, O., Nemeč, A. & Pohunek, P. (2002). Direct PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA. *J Clin Microbiol* 40, 3485–3488.
- Drevinek, P., Cinek, O., Meltzer, J., Langsadi, L., Navesnakova, Y. & Vavrova, V. (2003). Genomovar distribution of the *Burkholderia cepacia* complex differs significantly between Czech and Slovak patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 52, 603–604.
- Goering, R. V. (2004). Pulsed-field gel electrophoresis. In *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*, pp.185–196. Edited by D. H. Persing and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Govan, J. R., Brown, P. H., Maddison, J., Doherty, C. J., Nelson, J. W., Dodd, M., Greening, A. P. & Webb, A. K. (1993). Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* 342, 15–19.
- Johnson, W. M., Tyler, S. D. & Rozee, K. R. (1994). Linkage analysis of geographic and clinical clusters in *Pseudomonas cepacia* infections by multilocus enzyme electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol* 32, 924–930.
- Lessie, T. G., Hendrickson, W., Manning, B. D. & Devereux, R. (1996). Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiol Lett* 144, 117–128.
- LiPuma, J. J., Mortensen, J. E., Dasen, S. E., Edlind, T. D., Schildrow, D. V., Burns, J. L. & Stull, T. L. (1988). Ribotype analysis of *Pseudomonas cepacia* from cystic fibrosis treatment centers. *J Pediatr* 113, 859–862.
- LiPuma, J. J., Spilker, T., Coenye, T. & Gonzalez, C. F. (2002). An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *Lancet* 359, 2002–2003.
- Liu, L., Spilker, T., Coenye, T. & LiPuma, J. J. (2003). Identification by subtractive hybridization of a novel insertion element specific for two widespread *Burkholderia cepacia* genomovar III strains. *J Clin Microbiol* 41, 2471–2476.
- Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E., Foster, J., Lam, J. S. & Speert, D. P. (1996). Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 34, 1129–1135.
- Mahenthiralingam, E., Simpson, D. A. & Speert, D. P. (1997). Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 35, 808–816.
- Mahenthiralingam, E., Bischof, J., Byrne, S. K., Radomski, C., Davies, J. E., Av-Gay, Y. & Vandamme, P. (2000). DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol* 38, 3165–3173.
- Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Campbell, M. E. & 7 other authors (2001). Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. *Clin Infect Dis* 33, 1469–1475.
- Mahenthiralingam, E., Baldwin, A. & Vandamme, P. (2002). *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 51, 533–538.
- McDowell, A., Mahenthiralingam, E., Dunbar, K. E., Moore, J. E., Crowe, M. & Elborn, J. S. (2004). Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. *J Med Microbiol* 53, 663–668.
- Pegues, D. A., Carson, L. A., Tablan, O. C., FitzSimmons, S. C., Roman, S. B., Miller, J. M. & Jarvis, W. R. (1994). Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis. Summer Camp Study Group. *J Pediatr* 124, 694–702.
- Salman, L. & Siegel, J. (2003). Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24, S6–S52.
- Sajjan, U. S., Sun, L., Goldstein, R. & Forstner, J. F. (1995). Cable (cbl) type II pili of cystic fibrosis-associated *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*: nucleotide sequence of the *cblA* major subunit pilin gene and novel morphology of the assembled appendage fibers. *J Bacteriol* 177, 1030–1038.
- Speert, D. P., Henry, D., Vandamme, P., Corey, M. & Mahenthiralingam, E. (2002). Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis* 8, 181–187.
- Sun, L., Jiang, R. Z., Steinbach, S. & 7 other authors (1995). The emergence of a highly transmissible lineage of *cbl+* *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain. *Nat Med* 1, 661–666.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33, 2233–2239.
- Vandamme, P., Holmes, B., Coenye, T., Gortls, J., Mahenthiralingam, E., LiPuma, J. J. & Govan, J. R. (2003). *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. – a new twist to an old story. *Res Microbiol* 154, 91–96.

7.2 obsah ústního sdělení

Přednáška byla prezentována v rámci 14. evropského kongresu klinické mikrobiologie a infekčních nemocí (ECCMID) v Praze, abstrakt v *Clinical Microbiology and Infection*, 2004, Suppl 3:O 184.

Czech epidemic strain of *Burkholderia cenocepacia* does not belong to ET 12 lineage

S. Vosahlikova, H. Reitzova,
O. Cinek, P. Drevinek



Department of Paediatrics, 2nd Medical School, Charles
University, Prague, Czech Republic

Burkholderia cenocepacia:

- Gram-negative
- Belongs to the *B. cepacia* complex (comprising 9 closely related species)
- *B. cenocepacia* = genomovar III
Human pathogen causing chronic lung infection particularly in cystic fibrosis

Cystic fibrosis (CF):

CF is an autosomal recessive disease (1:2,500)
caused by defect in the chloride channel



- imbalance in the salt concentration
- thick mucus production in airways



susceptibility to infections with *S. aureus*,
P. aeruginosa, *S. maltophilia*,
B. multivorans or *B. cenocepacia*

B. cenocepacia is a dangerous pathogen in CF:

- Resistant to broad spectrum of antibiotics
- Causes serious infections worsening the lung function
- Capable of patient-to-patient spread



Epidemic strains exist within the *B. cenocepacia*
species

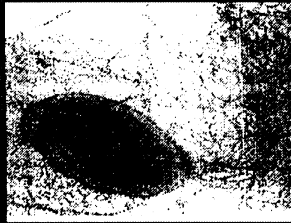
The most severe and virulent
epidemic strain: ET 12

ET 12

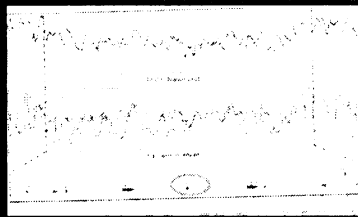
- Epidemic outbreaks in Canada and the United Kingdom



- Positive for both markers of transmissibility:
cblA BCESM



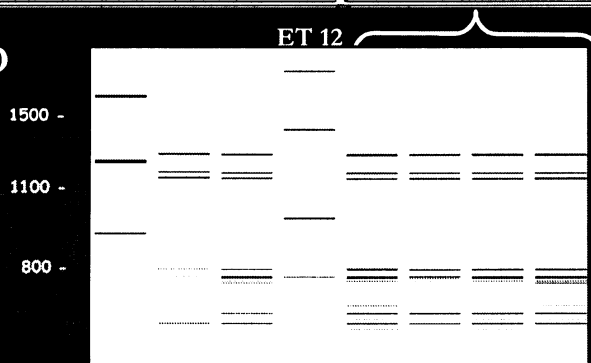
(U.S. Sajjan et al, 1995)



(A. Baldwin et al, 2004)

There is an epidemic strain in our CF patients

RAPD



In the Czech CF population, the epidemic strain within *B. cenocepacia* has been identified

Reference method for identification of ET 12 is detection of highly specific cblA

Aim of our study

To determine if the epidemic strain present in the Czech patients with CF belongs to ET 12 lineage

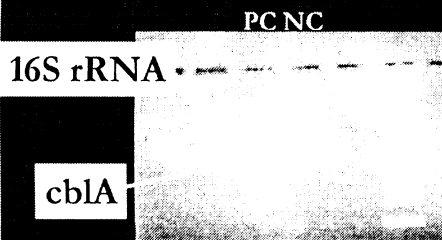
Patients

65 CF patients infected with *B. cenocepacia*
81 isolates collected 1997 - 2003

Methods

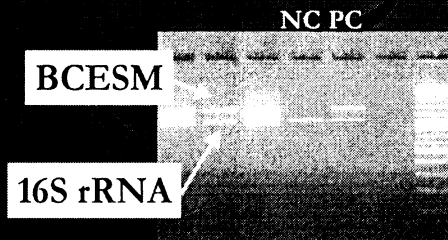
PCR targeting *cbIA*

(U.S. Sajjan et al, 1995)



PCR targeting BCESM

(E. Mahenthiralingam et al, 1997)



Results

All 81 isolates were:

■ *cblA* negative

■ BCESM positive



The Czech epidemic strain is not ET 12

Summary

1. The Czech CF population does not confront with highly virulent variant of transmissible *B. cenocepacia* strain ET 12: the Czech strain is *cblA*-negative.
2. The epidemic origin of the Czech *B. cenocepacia* strain was confirmed by its BCESM positivity

8 Seznam použité literatury

- Agodi, A., Mahenthiralingam, E., Barchitta, M., Giannino, V., Sciacca, A., Stefani, S. (2001): *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: prevalence, epidemiology, and genomovar status. *J Clin Microbiol.* 39: 2891-2896.
- Agodi, A., Barchitta, M., Giannino, V., Collura, A., Pensabene, T., Garlaschi, M.L., Pasquarella, C., Luzzaro, F., Sinatra, F., Mahenthiralingam, E., Stefani, S. (2002): *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients: identification of a cluster of epidemic lineages. *J Hosp Infect.* 50: 188-195.
- Baldwin, A., Sokol, P.A., Parkhill, J., Mahenthiralingam, E. (2004): The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun.* 72: 1537-1547.
- Biddick, R., Spilker, T., Martin, A., LiPuma, J.J. (2003): Evidence of transmission of *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia dolosa* among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett.* 228: 57-62.
- Brisse, S., Cordevant, C., Vandamme, P., Bidet, P., Loukil, C., Chabanon, G., Lange, M., Bingen, E. (2004): Species distribution and ribotype diversity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from French patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 42: 4824-4827.
- Burkholder, W.H. (1950): Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology.* 40: 115-117.
- Cartwright, D.K., Chilton, W.S., Benson, D.M. (1995): Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 211 - 216.
- Coenye, T., J.J., L., D., H., Hoste, B., K., V., M., G., Speert, D.P., P., V. (2001a): *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 271-279.
- Coenye, T., LiPuma, J.J., Henry, D., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gillis, M., Speert, D.P., Vandamme, P. (2001b): *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a

- new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 271-279.
- Coenye, T., Mahenthiralingam, E., Henry, D., LiPuma, J.J., Laevens, S., Gillis, M., Speert, D.P., Vandamme, P. (2001c): *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 1481-1490.
- Coenye, T., Spilker, T., Martin, A., LiPuma, J.J. (2002): Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* genomovar III. *J Clin Microbiol.* 40: 3300-3307.
- Coenye, T., Vandamme, P. (2003): Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* 5: 719-729.
- Coenye, T., Spilker, T., Van Schoor, A., LiPuma, J.J., Vandamme, P. (2004): Recovery of *Burkholderia cenocepacia* strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. *Thorax.* 59: 952-954.
- Conway, B.A., Venu, V., Speert, D.P. (2002): Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriol.* 184: 5678-5685.
- Cunha, M.V., Leitao, J.H., Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Lito, L., Barreto, C., Salgado, M.J., Sa-Correia, I. (2003): Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a Portuguese cystic fibrosis center: a 7-year study. *J Clin Microbiol.* 41: 4113-4120.
- De Soyza, A., Archer, L., McDowell, A., Moore, J., Dark, J.H., Elborn, S., Mahenthiralingam, E., Corris, P.A., Gould, K. (2001): Lung transplantation for cystic fibrosis; the effect of *B cepacia* genomovars on post transplant outcomes. *J Heart Lung Transplant.* 20: 158.
- Drevinek, P., Hrbackova, H., Cinek, O., Bartosova, J., Nyc, O., Nemec, A., Pohunek, P. (2002): Direct PCR Detection of *Burkholderia cepacia* Complex and Identification of Its Genomovars by Using Sputum as Source of DNA. *J Clin Microbiol.* 40: 3485-3488.
- Enright, M.C., Spratt, B.G. (1999): Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* 7: 482-487.
- Gillis, M., Van Van, T., Bardin, R., Goor, M., Hebbar, P., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T., Fernandez, M.P. (1995): Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and

- proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Bact.* 45: 274-289.
- Goering, R.V. (2004). Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. D. H. Persing, F. C. Tenover, J. Versalovic et al. Washington, DC, ASM Press: 185-196.
- Govan, J.R., Brown, P.H., Maddison, J., Doherty, C.J., Nelson, J.W., Dodd, M., Greening, A.P., Webb, A.K. (1993): Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet.* 342: 15-19.
- Govan, J.R., Deretic, V. (1996): Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 60: 539-574.
- Holmes, A., Nolan, R., Taylor, R., Finley, R., Riley, M., Jiang, R.Z., Steinbach, S., Goldstein, R. (1999): An epidemic of *Burkholderia cepacia* transmitted between patients with and without cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 179: 1197-1205.
- Chen, J.S., Witzmann, K.A., Spilker, T., Fink, R.J., LiPuma, J.J. (2001): Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. *J Pediatr.* 139: 643-649.
- Isles, A., Maclusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P., Levison, H. (1984): *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr.* 104: 206-210.
- Johnson, W.M., Tyler, S.D., Rozee, K.R. (1994): Linkage analysis of geographic and clinical clusters in *Pseudomonas cepacia* infections by multilocus enzyme electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol.* 32: 924-930.
- Jones, A.M., Dodd, M.E., Webb, A.K. (2001): *Burkholderia cepacia*: current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. *Eur Respir J.* 17: 295-301.
- Kato, H., Kato, N., Watanabe, K., Ueno, K., Ushijima, H., Hashira, S., Abe, T. (1994): Application of typing by pulsed-field gel electrophoresis to the study of *Clostridium difficile* in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 32: 2067-2070.
- Kiska, D.L., Kerr, A., Jones, M.C., Caracciolo, J.A., Eskridge, B., Jordan, M., Miller, S., Hughes, D., King, N., Gilligan, P.H. (1996): Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative

- nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 34: 886-891.
- Kostman, J.R., Alden, M.B., Mair, M., Edlind, T.D., LiPuma, J.J., Stull, T.L. (1995): A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. *J Infect Dis.* 171: 204-208.
- Lessie, T.G., Hendrickson, W., Manning, B.D., Devereux, R. (1996): Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiol Lett.* 144: 117-128.
- LiPuma, J.J., Dasen, S.E., Nielson, D.W., Stern, R.C., Stull, T.L. (1990): Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet.* 336: 1094-1096.
- LiPuma, J.J. (1998): *Burkholderia cepacia*. Management issues and new insights. *Clin Chest Med.* 19: 473-486, vi.
- LiPuma, J.J., Dulaney, B.J., McMenamin, J.D., Whitby, P.W., Stull, T.L., Coenye, T., Vandamme, P. (1999): Development of rRNA-based PCR assays for identification of *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 37: 3167-3170.
- LiPuma, J.J., Spilker, T., Gill, L.H., Campbell, P.W., 3rd, Liu, L., Mahenthiralingam, E. (2001): Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 164: 92-96.
- LiPuma, J.J., Spilker, T., Coenye, T., Gonzalez, C.F. (2002): An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *Lancet.* 359: 2002-2003.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B. (2002): Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 15: 194-222.
- Mahenthiralingam, E., Campbell, M.E., Foster, J., Lam, J.S., Speert, D.P. (1996a): Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 34: 1129-1135.
- Mahenthiralingam, E., Campbell, M.E., Henry, D.A., Speert, D.P. (1996b): Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 34: 2914-2920.

- Mahenthiralingam, E., Simpson, D.A., Speert, D.P. (1997): Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 35: 808-816.
- Mahenthiralingam, E., Bischof, J., Byrne, S.K., Radomski, C., Davies, J.E., Av-Gay, Y., Vandamme, P. (2000): DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol.* 38: 3165-3173.
- Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Campbell, M.E., Henry, D.A., Gravelle, A.M., Wong, L.T., Davidson, A.G., Wilcox, P.G., Nakielna, B., Speert, D.P. (2001): Infection with *Burkholderia cepacia* Complex Genomovars in Patients with Cystic Fibrosis: Virulent Transmissible Strains of Genomovar III Can Replace *Burkholderia multivorans*. *Clin Infect Dis.* 33: 1469-1475.
- Manno, G., Dalmastri, C., Tabacchioni, S., Vandamme, P., Lorini, R., Minicucci, L., Romano, L., Giannattasio, A., Chiarini, L., Bevivino, A. (2004): Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cepacia* strains, among patients attending an Italian Cystic Fibrosis Center. *J Clin Microbiol.* 42: 1491-1497.
- McDougal, L.K., Steward, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K., Tenover, F.C. (2003): Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol.* 41: 5113-5120.
- McDowell, A., Mahenthiralingam, E., Dunbar, K.E., Moore, J.E., Crowe, M., Elborn, J.S. (2004): Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. *J Med Microbiol.* 53: 663-668.
- McMenamin, J.D., Zacccone, T.M., Coenye, T., Vandamme, P., LiPuma, J.J. (2000): Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers: an analysis of 1,051 recent sputum isolates. *Chest.* 117: 1661-1665.
- Miller, S.C., LiPuma, J.J., Parke, J.L. (2002): Culture-based and non-growth-dependent detection of the *Burkholderia cepacia* complex in soil environments. *Appl Environ Microbiol.* 68: 3750-3758.

- Olive, D.M., Bean, P. (1999): Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 37: 1661-1669.
- Parke, J.L., Gurian-Sherman, D. (2001): Diversity of the Burkholderia Cepacia Complex and Implications for Risk Assessment of Biological Control Strains. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39: 225-258.
- Parker, W.L., Rathnum, M.L., Seiner, V., Trejo, W.H., Principe, P.A., Sykes, R.B. (1984): Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. *J Antibiot (Tokyo).* 37: 431-440.
- Pegues, D.A., Carson, L.A., Tablan, O.C., FitzSimmons, S.C., Roman, S.B., Miller, J.M., Jarvis, W.R. (1994): Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis. Summer Camp Study Group. *J Pediatr.* 124: 694-702.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., et al. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 245: 1066-1073.
- Sajjan, U.S., Sun, L., Goldstein, R., Forstner, J.F. (1995): Cable (cbl) type II pili of cystic fibrosis-associated Burkholderia (*Pseudomonas*) cepacia: nucleotide sequence of the cblA major subunit pilin gene and novel morphology of the assembled appendage fibers. *J Bacteriol.* 177: 1030-1038.
- Segonds, C., Heulin, T., Marty, N., Chabanon, G. (1999): Differentiation of Burkholderia species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol.* 37: 2201-2208.
- Shelly, D.B., Spilker, T., Gracely, E.J., Coenye, T., Vandamme, P., LiPuma, J.J. (2000): Utility of commercial systems for identification of Burkholderia cepacia complex from cystic fibrosis sputum culture. *J Clin Microbiol.* 38: 3112-3115.
- Siddiqui, A.H., Mulligan, M.E., Mahenthalingam, E., Hebden, J., Brewink, J., Qaiyumi, S., Johnson, J.A., LiPuma, J.J. (2001): An episodic outbreak of genetically related Burkholderia cepacia among non-cystic fibrosis patients at a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 22: 419-422.

- Speert, D.P., Henry, D., Vandamme, P., Corey, M., Mahenthiralingam, E. (2002): Epidemiology of *Burkholderia cepacia* Complex in Patients with Cystic Fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis.* 8: 181-187.
- Sun, L., Jiang, R.Z., Steinbach, S., Holmes, A., Campanelli, C., Forstner, J., Sajjan, U., Tan, Y., Riley, M., Goldstein, R. (1995): The emergence of a highly transmissible lineage of *cbl+* *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain. *Nat Med.* 1: 661-666.
- Tablan, O.C., Chorba, T.L., Schidlow, D.V., White, J.W., Hardy, K.A., Gilligan, P.H., Morgan, W.M., Carson, L.A., Martone, W.J., Jason, J.M., et al. (1985): *Pseudomonas cepacia* colonization in patients with cystic fibrosis: risk factors and clinical outcome. *J Pediatr.* 107: 382-387.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B. (1995): Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33: 2233-2239.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V. (1997): How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 18: 426-439.
- Turton, J.F., Kaufmann, M.E., Mustafa, N., Kawa, S., Clode, F.E., Pitt, T.L. (2003): Molecular comparison of isolates of *Burkholderia multivorans* from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 41: 5750-5754.
- Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K., Govan, J.R. (1997): Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 1188-1200.
- Vandamme, P., Mahenthiralingam, E., Holmes, B., Coenye, T., Hoste, B., De Vos, P., Henry, D., Speert, D.P. (2000): Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J Clin Microbiol.* 38: 1042-1047.
- Vandamme, P., Henry, D., Coenye, T., Nzula, S., Vancanneyt, M., LiPuma, J.J., Speert, D.P., Govan, J.R., Mahenthiralingam, E. (2002): *Burkholderia anthina*

- sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 33: 143-149.
- Vandamme, P., Holmes, B., Coenye, T., Goris, J., Mahenthiralingam, E., LiPuma, J.J., Govan, J.R. (2003): *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.--a new twist to an old story. *Res Microbiol.* 154: 91-96.
- Vermis, K., Coenye, T., Mahenthiralingam, E., Nelis, H.J., Vandamme, P. (2002): Evaluation of species-specific *recA*-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. *J Med Microbiol.* 51: 937-940.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., et al. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.