

**MASARYKOVA
UNIVERZITA**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Analýza bakteriomu
a mykobiomu z lokalit
dýchacích cest a krve
pacientů s inhalačním
traumatem**

Bakalářská práce

TEREZIE SLÁMOVÁ

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

Ústav biochemie

Brno 2021

MUNI
SCI

Bibliografický záznam

Autor:	Terezie Slámová Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav biochemie
Název práce:	Analýza bakteriomu a mykobiomu z lokalit dýchacích cest a krve pacientů s inhalačním traumatem
Studijní program:	Aplikovaná biochemie
Studijní obor:	Aplikovaná biochemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA
Akademický rok:	2020/2021
Počet stran:	54
Klíčová slova:	inhalační trauma; mikrobiota; dýchací cesty; bakterie; plísně; infekce; analýza; mikrobiom

Bibliographic record

Author: Terezie Slámová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Biochemistry

Title of Thesis: Bacteriome and mycobiome analysis from airway and blood of patients with inhalation injury

Degree Programme: Applied biochemistry

Field of study: Applied biochemistry

Supervisor: doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

Academic Year: 2021

Number of Pages: 54

Keywords: inhalation trauma, microbiota; airways; bacteria; fungi; infection; analysis; microbiome

Anotace

Inhalační trauma představuje akutní postižení dýchacích cest způsobené inhalací zplodin hoření nebo páry, toxických a dráždivých látek. Mezi nejčastější sekundární komplikace po inhalaci zplodin patří infekce dýchacích cest. Základním předpokladem pro úspěšnou terapii popálených pacientů s infekčními komplikacemi je precizní mikrobiologická surveillance v čase a vhodná antimikrobiální terapie. Cílem této práce bylo zpracovat literární rešerši k problematice mikrobioty (bakterií a kvasinek) u pacientů s inhalačním traumatem a podílet se na zavedení izolační metody pro následnou sekvenční analýzu bakteriomu a mykobiomu ve vzorcích od těchto pacientů. Byla zoptimalizovaná metodika izolace DNA, polymerázové řetězové reakce a poolování vzorků. Výsledný pool byl předán k dalším krokům. Zavedená metodika bude v navazující studii využita při sledování dynamických změn mikrobioty dýchacích cest u pacientů s inhalačním traumatem.

Abstract

Inhalation trauma is an acute injury of the respiratory system caused by the inhalation of combustion products or vapors, toxic and irritating substances. The most common secondary complications after inhalation of combustion products include respiratory infection. The basis for successful therapy of burn patients with infectious complications is precise microbiological surveillance in time and suited antimicrobial therapy. The main aims of this thesis were to conduct a research about the issue of microbiota (bacteria and yeast) in patients with inhalation trauma and to participate on introduction of an isolation method for sequencing analysis of bacteriome and mycobiome in samples of these patients. The methodology of DNA isolation, polymerase chain reaction and pooling of samples was optimized. The resulting pool was passed onto the next steps. The established methodology will be used in the following study to monitor dynamic changes of airway microbiota in patients with inhalation trauma.

ANALÝZA BAKTERIOMU A MYKOBIOMU Z LOKALIT DÝCHACÍCH CEST A KRVE PACIENTŮ S INHALAČNÍM TRAUMATEM

MUNI
SCI

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KOTLÁŘSKÁ 2, 611 37 BRNO
TČ: 00216224
DIČ: CZ00216224

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2020/2021

Ústav:	Ústav biochemie
Studentka:	Terezie Slámová
Program:	Aplikovaná biochemie
Obor:	Aplikovaná biochemie
Směr:	Klinická biochemie

Ředitel ústavu PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

Název práce:	Analýza bakteriomu a mykobiomu z lokalit dýchacích cest a krve pacientů s inhalačním traumatem
Název práce anglicky:	Bacteriome and mycobiome analysis from airway and blood of patients with inhalation injury
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:

Inhalační trauma představuje akutní poškození dýchacích cest způsobené inhalací zplodin hoření nebo páry. Výskyt infekčních komplikací u takových pacientů je velmi vysoký, dle řady studií dosahuje až 80 %. Základním předpokladem pro úspěšnou terapii těchto pacientů je precizní mikrobiologická surveillance a promptní reakce na všechny změny spolu s cílenou antimikrobiální terapií.

Cíle práce:

- Vytvoření literární rešerše k problematice mikrobioty (bakterií a kvasinek) u pacientů s inhalačním traumatem.
- Zavedení izolační metody pro následnou sekvenční analýzu bakteriomu a mykobiomu ve vzorcích od těchto pacientů.

Literatura:

1. CORCIONE, Silvia; LUPIA, Tommaso; DE ROSA, Francesco G. Microbiome in the setting of burn patients: implications for infections and clinical outcomes. *Burns & Trauma*, 2020, 8.
2. DYAMENAHALLI, Kiran, et al. Inhalation injury: unmet clinical needs and future research. *Journal of Burn Care & Research*, 2019, 40.5: 570-584.
3. LIODAKI, Eirini, et al. Prophylactic antibiotic therapy after inhalation injury. *Burns*, 2014, 40.8: 1476-1480.

Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA
Datum zadání práce:	5. 10. 2020
V Brně dne:	9. 5. 2021

Terezie Slámová, 23. 3. 2021
doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA, 29. 3. 2021
RNDr. Jitka Kašparovská, Ph.D., 31. 3. 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 20. května 2021

.....
Terezie Slámová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Petře Bořilové Linhartové, Ph.D., MBA za odbornou pomoc, trpělivost a vedení při psaní této práce. Děkuji RNDr. Petře Šplíchalové, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři pro analýzu mikrobiomu RECETOX. Za finanční podporu bych chtěla poděkovat projektu Startupu Fakultní nemocnice Brno s názvem Molekulárně genetická analýza dynamických změn mikrobiomu dýchacích cest u pacientů s inhalačním traumatem. Také bych chtěla poděkovat Bc. Daniele Gachové za pomoc při práci v laboratoři, cenné rady, ochotu a čas, který mi věnovala. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a přátelům za podporu, kterou mi poskytli.

Obsah

Seznam pojmů a zkratk	13
1 ÚVOD	14
2 TEORETICKÁ ČÁST	15
2.1 Inhalační trauma.....	15
2.1.1 Diagnostika inhalačního traumatu.....	17
2.1.2 Komplikace spojené s inhalačním traumatem	18
2.1.3 Mikrobiologická surveillance.....	20
2.2 Mikrobiota dýchacích cest.....	20
2.2.1 Zdravá mikrobiota dýchacích cest.....	21
2.2.2 Dysbióza dýchacích cest.....	22
2.3 Mikrobiom ve vztahu k inhalačnímu traumatu.....	23
2.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
2.3.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	26
2.3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	27
2.3.4 Další bakteriální druhy asociované s inhalačním traumatem	27
2.3.5 Rod <i>Candida</i>	28
2.4 Antimikrobiální terapie u pacientů s inhalačním traumatem a infekčními komplikacemi	28
3 Cíl práce	30
4 Praktická část	31
4.1 Materiál a metody	31
4.1.1 Izolace DNA a kontrola kvality gDNA.....	32
4.1.2 První kolo amplifikace 16S rRNA.....	35
4.1.3 Kontrola kvality po amplifikaci.....	37
4.1.4 PCR Clean up	37
4.1.5 Kontrola kvality PCR produktů po přečištění.....	38
4.1.6 Měření koncentrace přečištěných PCR produktů	38
4.1.7 Poolování vzorků před indexací.....	39

4.1.8	Následující zpracování vzorků	39
4.2	Výsledky	40
4.2.1	Izolace DNA a kontrola kvality gDNA.....	40
4.2.2	Kontrola kvality po amplifikaci.....	42
4.2.3	PCR Clean up	43
4.2.4	Měření koncentrace přečištěných PCR produktů	43
4.2.5	Poolování vzorků před indexací.....	44
4.3	Diskuse.....	45
5	Závěr	47
	Použité zdroje	48

Seznam pojmů a zkratek

ARDS	- syndrom akutní plicní nedostatečnosti
BAL	- bronchoalveolární laváž
BP	- bukální sliznice pravá
BSA	- celková plocha těla
COPD	- chronická obstrukční plicní nemoc
CS	- cystická fibróza
CT	- počítačová tomografie
EMP	- Earth microbiome project
ETA	- endotracheální aspirát
FOB	- fibrooptická bronchoskopie
gDNA	- genomová deoxyribonukleová kyselina
MDR	- odolnost na více léčiv
MIC	- minimální inhibiční koncentrace
OP	- nosohltan pravý
PCR	- polymerázová řetězová reakce
RNáza	- ribonukleáza
rRNA	- ribozomální ribonukleová kyselina
SIRS	- syndrom akutní plicní nedostatečnosti
SOP	- standardní operační postup
TBAS	- tracheobronchiální aspirát
TBSA	- celková popálená plocha těla
VAP	- ventilátorová pneumonie

1 ÚVOD

Dýchací cesty lze rozdělit na horní cesty dýchací (dutina nosní, nosohltan a hltan) a dolní cesty dýchací (hrtan, průdušnice, průdušky a plíce). Během posledního desetiletí se ukázalo, že dýchací cesty nejsou sterilní, jak se dříve myslelo, ale skládají se z komplexního mikrobiálního společenství nazývaného mikrobiota. Dýchací cesty představují vstupní bránu pro řadu mikroorganismů, které je následně osídlují (Nguyen *et al.*, 2015).

Tato práce je zaměřena na mikrobiotu (bakterie a kvasinky) osídlující horní a dolní cesty dýchací u popálených pacientů s inhalačním traumatem. Toto onemocnění představuje akutní postižení dýchacích cest způsobené poškozením horních a dolních cest dýchacích inhalací zplodin hoření nebo páry (Ziegler *et al.*, 2019). Ve spojitosti s oslabenými obrannými mechanismy dýchacích cest, které mají za následek rozvoj infekce, jsou zkoumány mikroorganismy: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* a další.

Role mikrobioty při udržování zdravé sliznice dýchacích cest a jeho následná reakce na inhalační poranění je dosud ne zcela známá, a proto je hodna dalšího zkoumání. Lepší pochopení těchto procesů by mohlo zdokonalit diagnostiku pacientů s inhalačním traumatem a přispět k optimalizaci jejich terapie zaměřené na obnovení zdravé bakteriální flóry dýchacích cest u pacientů po dysbióze (Dyamenahalli *et al.*, 2019). Studium mikrobioty se dá považovat za relativně novou oblast zkoumání a právě její důkladná znalost může pomoci individualizovat terapeutický přístup (Corcione *et al.*, 2020; Twigg *et al.*, 2017).

Cílem práce bylo zavedení izolační metody pro následnou sekvenační analýzu mikrobiomu (bakteriomu) ve vzorcích od popálených pacientů s inhalačním traumatem.

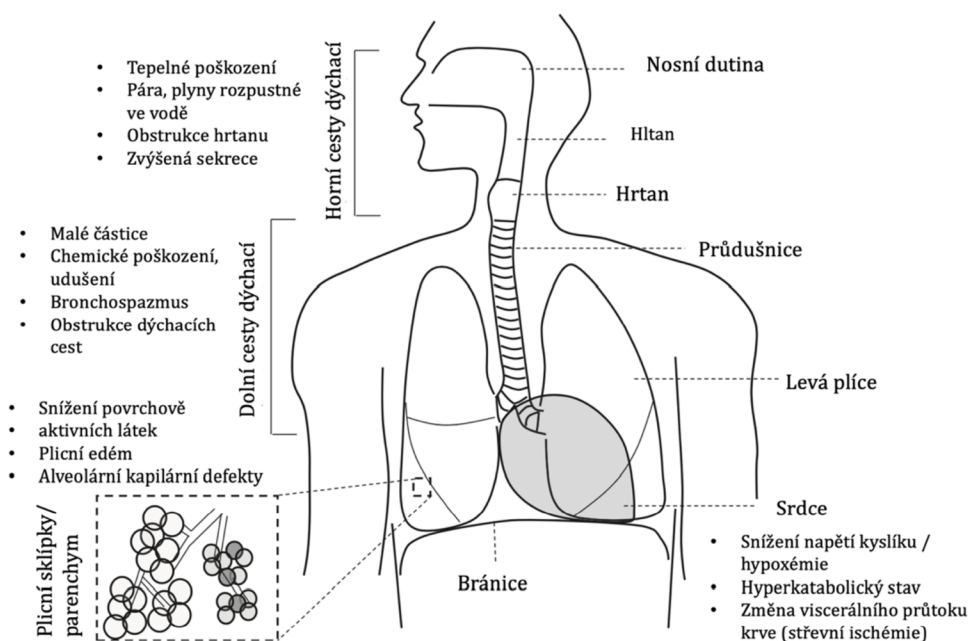
2 TEORETICKÁ ČÁST

V teoretické části bakalářské práce je popsáno postižení dýchacích cest, tzv. inhalační trauma, jeho diagnostika a infekční komplikace s ním spojené. Dále je charakterizována mikrobiota dýchacích cest zdravé populace a následně je popsána nerovnováha mikrobioty, která vede k dysbióze. Způsoby diagnostiky a s tím související mikrobiologická surveillance, která má za úkol poskytnout údaje o patogenech kolonizujících respirační trakt, jsou vysvětleny v další části bakalářské práce. Následně jsou popsány konkrétní mikroorganismy nalezeny v dýchacích cestách a asociovány s inhalačním traumatem. V závěru teoretické části je zmiňována antimikrobiální terapie pacientů s inhalačním traumatem.

2.1 Inhalační trauma

Inhalační trauma představuje akutní postižení dýchacích cest způsobené poškozením horních a dolních cest dýchacích, mezi které patří chemické poškození respiračního traktu nebo inhalace zplodin hoření nebo páry. Inhalace horkého vzduchu může poškodit horní cesty dýchací, zatímco dolní cesty mohou zůstat nedotčeny. (Ziegler *et al.*, 2019).

Akutní poranění dýchacích cest při inhalačním traumatu má jedinečnou patofyziologickou charakteristiku vlivem vdechováním kouře a zplodin (Xiao *et al.*, 2018). Anatomicky se inhalační poranění může dělit do tří tříd: 1) tepelné poškození, které poškozuje převážně horní cesty dýchací nad oblast karina, 2) lokální chemické podráždění dýchacích cest, při kterém dochází k poškození epitelálních buněk, snížení bakteriální clearance a ke zničení mukociliárního transportu, 3) systémová toxicita, která může nastat při vdechování oxidu uhelnatého nebo kyanidu (Dries *et al.*, 2013). Konkrétní postižení respiračního traktu je znázorněno na obrázku č. 2.



Obrázek č. 2: Známé respirační a systémové účinky inhalačního poškození. Vystavení ohni a kouři způsobuje zranění přímými tepelnými účinky jakož i usazováním toxických částic a dráždivých látek v respiračním traktu. Tyto účinky jsou patologické a na několika odlišných anatomických úrovních: horní cesty dýchací, dolní cesty dýchací nebo tracheobronchiální systém, plicní sklípky / parenchym a vzdálené orgánové systémy (Dyamenahalli *et al.* 2019, upraveno)

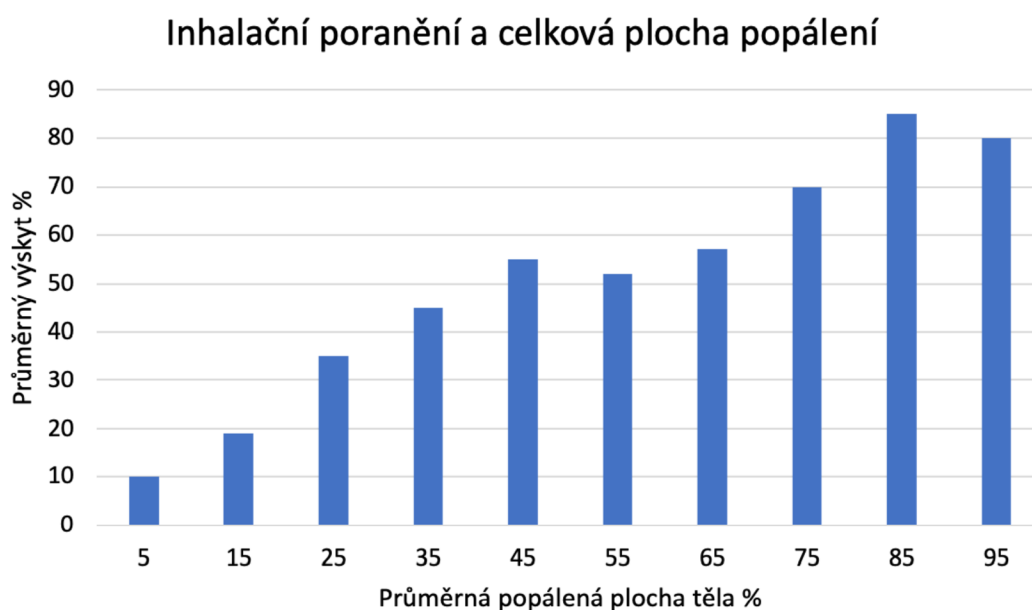
Nedokonalé spalování materiálů jako jsou plasty, guma, dřevo nebo bavlna, které se běžně vyskytují v požárech, způsobují uvolnění toxických výparů, které mají za následek těžké poranění sliznic dýchacích cest. Mezi hlavní škodlivé složky kouře patří vysoká teplota, dráždivé látky a toxiny (Xiao *et al.*, 2018).

Tyto látky mohou ve sliznici dýchacích cest a v plicním parenchymu vytvářet kaskádovou reakci mediátorů zánětu, které následně vedou k poškození sliznice, bronchoalveolárnímu zánětu a následnému plicnímu edému (Xiao *et al.*, 2018).

Inhalační trauma narušuje mukociliární clearance a může poškodit alveolární makrofágy, kteří představují poslední obrannou linii v respiračním traktu (Al Ashry *et al.*, 2016). Klinické příznaky a prognóza inhalačního traumatu se často zhoršují vlivem přítomnosti popálenin a bakteriální infekce (Murakami *et al.*, 2003).

Inhalační poranění je přítomno u 10 až 20 % všech popálených pacientů a významně zvyšuje morbiditu a mortalitu (Corcione *et al.*, 2020; Walker *et al.*, 2015). Mezi další faktory spojené s významným zvýšením úmrtnosti patří velikost popálené plochy těla a věk pacienta (Walker *et al.*, 2015). Zvýšený výskyt inhalačního poranění s rostoucí velikostí

popálené plochy těla je znázorněn na obrázku č. 1 (Dries *et al.*, 2013). Pokud jsou u pacienta s inhalačním traumatem zároveň kožní popáleniny, pak vyvolaná masivní zánětlivá reakce zvyšuje požadavky na tekutinovou resuscitaci (Dries *et al.*, 2013; Enkhbaatar *et al.*, 2016). Přestože se léčba a péče o pacienty, kteří utrpěli rozsáhlé kožní popáleniny v posledních desetiletích výrazně zlepšila, zůstává terapie inhalačního poranění stále náročná (Dyamenahalli *et al.*, 2019; Gülhan *et al.*, 2020). Terapie poraněné tkáně dýchacích cest spočívá v ošetření a profylaxii před sekundárním poškozením (Dyamenahalli *et al.*, 2019).



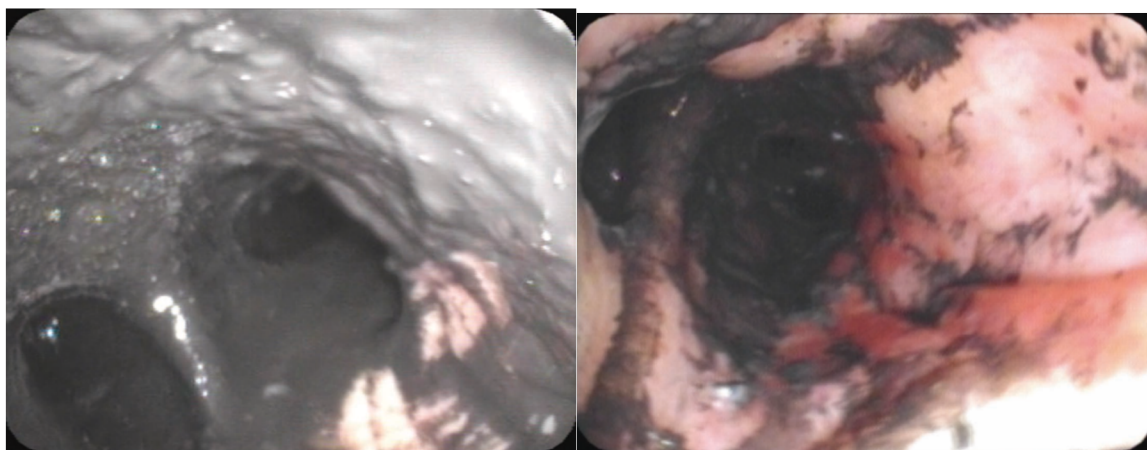
Obrázek č. 1: Graf závislosti mezi průměrnou plochou popálení a výskytem inhalačního poranění. (Dries *et al.*, 2013, upraveno)

2.1.1 Diagnostika inhalačního traumatu

Diagnóza inhalačního traumatu často spoléhá na subjektivní rozhodnutí lékařů na základě pozorování a zjištění obličejových a respiračních poranění (Yamamura *et al.*, 2015). Je založena na fyzikálních nálezech zahrnujících poranění obličeje, popálené nosní chloupky, saze v proximálních dýchacích cestách, produkce uhlíkového sputa a v neposlední řadě může ke správné diagnostice přispět i vyšetření hlasu (Dries *et al.*, 2013).

Podezření na poranění při vdechování kouře se potvrzuje bronchoskopickým vyšetřením, které je zachyceno na obrázku č. 3 (Yamamura *et al.*, 2015). Včetně fibrooptické bronchoskopie (FOB) se také využívá diagnostika xenonovými plicními skeny, dále pomocí počítačové tomografie (CT) nebo měření karboxyhemoglobinu (Dries *et al.*, 2013;

Walker *et al.*, 2015). Flexibilní FOB je považována de facto za standardní vyšetření, protože umožňuje přímou vizualizaci horních a proximálních dolních cest dýchacích, avšak neumožňuje vyhodnotit respirační bronchioly a alveoly, kde může být horší výměna plynů a dramaticky změněná homeostáza. Bronchoskopická metoda vyšetření mimo jiné představuje zvýšené riziko bakteriální kontaminace a je často provázeno následnou infekcí dolních cest dýchacích (Ziegler *et al.*, 2019).



Obrázek č. 3: Vlevo: Bronchoskopický pohled na karinu u pacienta s inhalačním traumatem. Jedná se o závažné až masivní postižení. Fotografie je zachycena v den úrazu. **Vpravo: Bronchoskopický pohled do pravého dolního plicního laloku s bronchy u pacienta s inhalačním traumatem.** Jedná se o závažné až masivní postižení. Fotografie je pořízena v den úrazu. Autor fotografií: doc. MUDr. Břetislav Lipový, Ph.D., MBA.

2.1.2 Komplikace spojené s inhalačním traumatem

Vdechování kouře nebo toxických látek dále vede ke komplikacím jako je chronická obstrukční plicní nemoc (COPD), syndrom systémové zánětové odpovědi (SIRS), závažné respirační selhání, zápal plic a syndrom akutní plicní nedostatečnosti (ARDS) (Xiao *et al.*, 2018; Yamamura *et al.*, 2015). Podle studie Al Ashry *et al.* (2016) je výskyt zápalu plic u popálených pacientů s inhalačním traumatem dvakrát vyšší než u pacientů bez inhalačního traumatu.

Mezi nejčastější komplikace po inhalaci zplodin patří infekce dýchacích cest (Walker *et al.*, 2015). Infekční komplikace u těžce popálených pacientů jsou v současné době právě jednou z život ohrožujících komplikací a způsobují zvýšený nárůst morbidit a mortality na 50 až 75 % (Gülhan *et al.*, 2020; Lipový *et al.*, 2011).

Inhalační poranění vede ke zničení výstelky dýchacích cest a dochází ke ztrátě jejich životně důležitých funkcí. Výsledný efekt otevírá bránu k infekci a nekrotický endotel

je vynikajícím růstovým médiem pro mikroorganismy (Lipovy *et al.*, 2011). Ztráta integrity epitelu a narušení buněčné funkce v dýchacích cestách snižuje bakteriální clearance (Enkhbaatar *et al.*, 2016). Zánět dýchacích cest spolu s plicním edémem zhoršují výměnu plynů (Liodaki *et al.*, 2014). Všechny tyto faktory zvyšují riziko vzniku infekce dýchacích cest (Enkhbaatar *et al.*, 2016; Liodaki *et al.*, 2014).

Chemické podráždění dýchacích cest způsobuje obnažení dýchací sliznice, která se následně odlupuje. Chemické poškození dále stimuluje vazomotorické a senzorycké nervové zakončení k produkci neuropeptidů a může docházet ke vzniku zánětu (Walker *et al.*, 2015).

Tepelné poranění aktivuje zánětlivou reakci hostitele, která ve spojení s přímým poškozením plic vystavuje nejen dýchací cesty riziku infekce. Stejně jako u chemického podráždění dochází vlivem tepelného poranění k odlupování epitelu v dýchacích cestách a dochází k narušení produkce povrchově aktivních látek (Walker *et al.*, 2015).

Riziko infekce u popálených pacientů se zvyšuje s delší dobou hospitalizace, zavedením močových katetrů, endotracheální intubací, inhalačním poraněním, arteriálním nebo žilním vstupem a mimo jiné použitím invazivních lékařských nástrojů (Corcione *et al.*, 2020; Lachiewicz *et al.*, 2017). Za poslední desetiletí došlo ke snížení počtu infekcí krevního řečiště souvisejících s katetrem, zatímco výskyt infekcí dýchacích cest zůstává stabilní (van Duin *et al.*, 2016).

Infekce kůže a měkkých tkání u popálených pacientů se objeví brzy po přijetí na jednotku intenzivní péče, zatímco infekce dýchacích cest v důsledku inhalačního traumatu, stejně jako infekce krve představuje pozdější komplikace (Lachiewicz *et al.*, 2017; van Duin *et al.*, 2016).

Poškození popálením může vést ke stavu zhoršené imunoregulace a k vyvinutí stavu relativního kompromisu imunitního systému, díky němuž budou popálení pacienti vysoce náchylní k infekcím (Beckmann *et al.*, 2018; Corcione *et al.*, 2020). Nakonec mohou pacienti s popáleninami utrpět infekce, které jsou běžné pro ostatní pacienty během hospitalizace (Avni *et al.*, 2010).

2.1.3 Mikrobiologická surveillance

Precizní mikrobiologická surveillance u pacientů s inhalačním traumatem má za úkol poskytnout údaje o patogenech kolonizujících dolní dýchací cesty a zároveň posoudit jejich citlivost. Biologický materiál dolních cest dýchacích je pravidelně sledován odběrem mikrobiologického materiálu pro kultivaci (Brusselaers *et al.*, 2012).

Mikrobiologická surveillance je obecně prováděna třikrát za týden nebo každý třetí den ze vzorků sputa, bronchiálního aspirátu (BAL), tracheobronchiálního aspirátu (TBAS) nebo endotracheálního aspirátu (ETA) (Brusselaers *et al.*, 2012; Liodaki *et al.*, 2014; Lipovy *et al.*, 2011). BAL je promytí plicních segmentů a využívá se k diagnostice infekcí, ale hlavně má terapeutický význam a slouží k výplachu plic (Foncerrada *et al.*, 2018).

U bronchoskopické diagnostiky se nejčastěji využívá vzorek pro kultivaci z BAL, protože bylo zjištěno, že tato metoda je při identifikaci organismu specifitější a citlivější než jiné metody (Rogers *et al.*, 2014; Lipovy *et al.*, 2011). Mikrobiota v plicích a dýchacích cestách se liší v závislosti na místě odběru vzorků (BAL, ETA) (Beck *et al.*, 2012). Bylo zjištěno, že vzorky sputa vykazují významně nižší bakteriální rozmanitost než ostatní typy vzorků, zatímco vzorky BAL a bronchiální biopsie vykazují podobné bakteriální složení (Dima *et al.*, 2019).

2.2 Mikrobiota dýchacích cest

Mikrobiota je popsána jako ekologické společenství symbiotických, patogenních a komenzálních mikroorganismů, které existují ve všech částech těla a které se vyvinuly společně se stravou, životním stylem, genetickými a imunitními faktory (Chellappan *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2019).

Během posledního desetiletí se ukázalo, že dýchací cesty nejsou sterilní, jak se dříve myslelo, ale skládají se z komplexního mikrobiálního společenství. Lidský respirační trakt představuje hlavní vstupní bránu pro řadu mikroorganismů, zejména těch, které se vyskytují ve vzduchu jako částice a patří mezi ně bakterie, houby nebo viry (Nguyen *et al.*, 2015). Složení mikrobioty u zdravých jedinců obsahuje vyvážené složení symbiontů a patobiontů a je určeno hlavně dynamickou rovnováhou mezi imigrací a eliminací (Dima *et*

al., 2019; Zakharkina *et al.*, 2017). Mikroorganismy osídlující horní a dolní cesty dýchací interagují s lidským organismem a mohou působit ve prospěch hostitele nebo být příčinou patologie (Twigg *et al.*, 2017). Mikrobiota nejen dýchacích cest úzce souvisí s diskriminanty hostitele, tedy s jeho imunitním systémem daným celkovým zdravotním stavem a genetickými predispozicemi (Dima *et al.*, 2019). Mikrobiota dýchacích cest je jedinečná a specifická pro každého jedince (Nguyen *et al.*, 2015). Složení mikrobioty v této lokalitě závisí na třech ekologických faktorech včetně imigrace mikroorganismů do dýchacích cest, eliminace mikroorganismů z dýchacích cest a na podmínkách pro růst. Bylo publikováno, že složení plicní mikrobioty se neliší od mikrobioty osídlující horní cesty dýchací a dutinu ústní, což může naznačovat, že plicní mikrobiota pochází z horních cest dýchacích a dostává se prostřednictvím mikroaspirace nebo přímé disperze na sliznici (Chellappan *et al.*, 2019). Horní cesty dýchací mohou tedy působit jako rezervoár mikrobioty pro dolní cesty dýchací (Dyamenahalli *et al.*, 2019). V dýchacích cestách neexistují žádné fyzikální bariéry a složení mikrobioty je tedy dynamické a přechodné (Dima *et al.*, 2019).

2.2.1 Zdravá mikrobiota dýchacích cest

Plíce byly tradičně považovány za sterilní orgán, ale použitím mikrobiální detekce nezávislé na kultivaci, jako je 16S rRNA sekvenování, dochází k vyvrácení tohoto názoru a ke zjištění, že v plicích je přítomna mikrobiota (Twigg *et al.*, 2017). Bylo zjištěno, že zdravá mikrobiota dýchacích cest je převážně složena z bakterií kmene *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* a kmene *Fungi* (Barfod *et al.*, 2013; Chellappan *et al.*, 2019; Dyamenahalli *et al.*, 2019). Dýchací cesty zdravých jedinců jsou osídleny bakteriemi rodu *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Cyanobacteria* a houbami rodu *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* (Barfod *et al.*, 2013; Charlson *et al.*, 2011; Chellappan *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2019). Zatímco rody *Neisseria* a *Haemophilus* z kmene *Proteobacteria* jsou u zdravých jedinců méně časté (Charlson *et al.*, 2011). Většina výzkumných studií o respirační mikrobiotě se zaměřila především na bakterie a jejich dopad na zdraví dýchacích cest. Existují však důkazy, že i jiné nebakteriální organismy (viry) mohou hrát důležitou roli u zdravých jedinců (Nguyen *et al.*, 2015).

V respiračním traktu zdravého jedince ze vzorků BAL bylo zjištěno, že převládají plísně a kvasinky rodů *Candida*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Davidiella*, *Cryptococcus* s nejčastějšími plísňovými nebo kvasinkovými druhy *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Eremothecium sincaudum* (Nguyen *et al.*, 2015).

Kvantitu a kvalitu složení mikrobioty ovlivňuje několik faktorů včetně stravy, životního prostředí, léčby a infekce (Beckmann *et al.*, 2018). Mikrobiální rozmanitost se liší na základě rozdílné ekologie nebo dokonce přítomnosti domácích mazlíčků. Při interpretaci údajů o mikrobiotě je potřeba vzít v úvahu i podnebí a geografii (Beck *et al.*, 2012).

2.2.2 Dysbióza dýchacích cest

Změny v mikrobiotě dýchacích cest, které ovlivňují vnitřní prostředí a umožňují rozšíření málo hojných mikrobiálních populací s patogenním potenciálem, vedou k dysbióze. Ztrátou rovnováhy mezi imigrací a eliminací mikroorganismů může dojít ke zvýšenému růstu mikroorganismů s patogenním potenciálem v dýchacích cestách. K faktorům definujícím imigraci patří mikroaspirace a vdechování mikroorganismů. K faktorům ovlivňujícím eliminaci patří mukociliární clearance, vrozená a adaptivní obrana hostitele (Dima *et al.*, 2019). Samotná nerovnováha mikrobioty nastává až po komplikaci, která může představovat i inhalační trauma (Corcione *et al.*, 2020). Bakterie rodu *Pseudomonas* mohou přednostně kolonizovat endotracheální trubici, která se využívá při intubaci pacienta a v důsledku toho změnit mikrobiotu plic (Dyamenahalli *et al.*, 2019). Mikrobiom dýchacích cest udržuje zdravou sliznici dýchacích cest a jeho reakce na poranění může generovat léčbu k obnovení normální bakteriální flóry po dysbióze (Moffatt *et al.*, 2020).

Mykobiota (houby a kvasinky) má schopnost vstoupit do dutiny dýchacích cest vdechováním a může způsobit respirační potíže. Respirační trakt nejčastěji obývají kvasinkové a houbové patogeny jako *Candida albicans* nebo *Aspergillus fumigatus* (Nguyen *et al.*, 2015). Kromě způsobení klinických plísňových infekcí může mít plicní mykobiom závažné zánětlivé účinky, které mohou onemocnění plic vyvolat nebo zhoršit jejich průběh (Tipton *et al.*, 2017). Často jsou spojovány s chronickými plicními chorobami jako je astma, COPD, CS nebo se objevují po transplantaci plic (Nguyen *et al.*, 2015; Tipton *et al.*,

2017). Studium mykobioty má stále svoje omezení, protože lidské plíce jsou obtížně přístupné a způsoby odběru vzorku z plic pomocí sputa nebo BAL se mohou snadno kontaminovat z horních cest dýchacích (Tipton *et al.*, 2017). Další problém může představovat obtížná izolace fungálních buněk nebo rozlišení DNA živých nebo mrtvých mikroorganismů (Nguyen *et al.*, 2015).

2.3 Mikrobiom ve vztahu k inhalačnímu traumatu

V případě inhalačního traumatu dochází v dýchacích cestách k několika fyziologickým změnám jako je zánět a edém, které mohou pozměnit mikrobiom dýchacích cest (Dyamenahalli *et al.*, 2019).

Grampozitivní bakterie jsou v lokalizaci dýchacích cest přítomny během prvních dní hospitalizace, zatímco odolnější gramnegativní bakterie převládají v pozdějších fázích (Gülhan *et al.*, 2020; Lachiewicz *et al.*, 2017; van Duin *et al.*, 2016). Nejčastěji izolované bakteriální nebo kvasinkové rody z dýchacích cest popálených pacientů s inhalačním traumatem byly: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Candida* (Brusselsaers *et al.*, 2012; Corcione *et al.*, 2020; Liodaki *et al.*, 2014; Lipovy *et al.*, 2011).

S inhalačním traumatem byly asociovány mikroorganismy: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida non-albicans* (Brusselsaers *et al.*, 2012; Liodaki *et al.*, 2014; Lipovy *et al.*, 2011) a další bakteriální druhy a rody, viz přehled v Tabulce I.

TEORETICKÁ ČÁST

Tabulka I: Mikroorganismy asociované s inhalačním traumatem.

Mikroorganismy	Citace	Metodika	Parametry	Pacienti celkem	Charakterizovaná populace	Asociace
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Brusselsaers <i>et al.</i> , 2012)	ETA	n MDR/celkově (%) 10/37 izolací (27 %)	53	Věk: 44 let TBSA: 35,0 % Muži: 33/53 Mechanická ventilace: 17 dní Doba hospitalizace: 34 dní	VAP
	(Rogers <i>et al.</i> , 2014)	BAL/ETA/sputum	9/59 izolací	92	Věk: 3,5 let TBSA: 30 % Muži: 54/92	VAP Pneumonie
	(Tanizaki <i>et al.</i> , 2012)	-	n MDR 8 izolací (30,7 %)	26	Věk: 51,2 ± 16,9 let TBSA: 40,1 ± 20,0% Muži: 20/26	VAP
	(Gülhan <i>et al.</i> , 2020)	Krevní kultura	13 pacientů, 31,7 %	41	Věk: 3 (1,7 – 6,1) let BSA: 24,1 ± 14,7 %	Sepse
	(Costa <i>et al.</i> , 2016)	Respirační sekret	15 % izolací	126	Věk: 49,1 ± 18,8 let Muži: 92/126 Inhalační trauma: 17 pacientů	Respirační infekce
<i>Acinetobacter baumannii</i>	(Brusselsaers <i>et al.</i> , 2012)	ETA	n MDR/celkově (%) MDR nefermentující	53	Věk: 44 let TBSA: 35,0 % Muži: 33/53 Mechanická ventilace: 17 dní Doba hospitalizace: 34 dní	VAP
	(Rogers <i>et al.</i> , 2014)	BAL/ETA/sputum	-	92	Věk: 3,5 let TBSA: 30 % Muži: 54/92	VAP Pneumonie
	(Gülhan <i>et al.</i> , 2020)	Krevní kultura	17 pacientů, 41,5 %	41	Věk: 3 (1,7 – 6,1) let BSA: 24,1 ± 14,7 %	sepsis
<i>Staphylococcus aureus</i>	(Brusselsaers <i>et al.</i> , 2012)	ETA	n MDR/celkově (%) 0/11 (0 %)	53	Věk: 44 let TBSA: 35,0 % Muži: 33/53	VAP
	(Tanizaki <i>et al.</i> , 2012)	-	n MDR 16 izolací (61,5 %)	26	Věk: 51,2 ± 16,9 let TBSA: 40,1 ± 20,0% Muži: 20/26	VAP
	(Rogers <i>et al.</i> , 2014)	BAL/ETA/sputum	9/59 izolací	92	Věk: 3,5 let TBSA: 30 % Muži: 54/92	VAP
	(Reardon <i>et al.</i> , 1998)	-	MRSA	40	Věk: 31,7 ± 25,5 let BSA: 19,1 ± 15,4 % Doba hospitalizace: 37,1 ± 31,4 dní Počet úmrtí: 4	Infekční komplikace
		-	MSSA	38	Věk: 33,8 ± 26,5 let BSA: 12,5 ± 10,0 % Doba hospitalizace: 30,9 ± 25,5 dní Počet úmrtí: 0	Infekční komplikace
(Costa <i>et al.</i> , 2016)	Respirační sekret	20 % izolací	126	Věk: 49,1 ± 18,8 let Muži: 92/126	Respirační infekce	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	(Brusselsaers <i>et al.</i> , 2012)	ETA	n MDR/celkově (%) 2/7 (28,6 %)	53	Věk: 44 let TBSA: 35,0 % Muži: 33/53 Mechanická ventilace: 17 dní Doba hospitalizace: 34 dní	VAP
	(Rogers <i>et al.</i> , 2014)	BAL/ETA/sputum	18/59 izolací	92	Věk: 3,5 let TBSA: 30 % Muži: 54/92	VAP Pneumonie

Mikroorganismy	Citace	Metodika	Parametry	Pacienti celkem	Charakterizovaná populace	Asociace
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	(Costa <i>et al.</i> , 2016)	Respirační sekret	10 % izolací	126	Věk: 49,1 ± 18,8 let Muži: 92/126	Respirační infekce
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	(Brusselsaers <i>et al.</i> , 2012)	ETA	n MDR/celkově (%) 0/2 (0 %)	53	Věk: 44 let TBSA: 35,0 % Muži: 33/53 Mechanická ventilace: 17 dní Doba hospitalizace: 34 dní	VAP
<i>Escherichia coli</i>	(Brusselsaers <i>et al.</i> , 2012)	ETA	n MDR/celkově (%) 1/2 (50 %)	53	Věk: 44 let TBSA: 35,0 % Muži: 33/53 Mechanická ventilace: 17 dní Doba hospitalizace: 34 dní	VAP
<i>Haemophilus influenzae</i>	(Brusselsaers <i>et al.</i> , 2012)	ETA	n MDR/celkově (%) 0/7 (0 %)	53	Věk: 44 let TBSA: 35,0 % Muži: 33/53 Mechanická ventilace: 17 dní Doba hospitalizace: 34 dní	VAP
	(Rogers <i>et al.</i> , 2014)	ETA/BAL/sputum	-	92	Věk: 3,5 let TBSA: 30 % Muži: 54/92	Pneumonie
Rod Klebsiella	(Brusselsaers <i>et al.</i> , 2012)	ETA	n MDR/celkově (%) 0/6 (0 %)	53	Věk: 44 let TBSA: 35,0 % Muži: 33/53 Mechanická ventilace: 17 dní Doba hospitalizace: 34 dní	VAP
	(Rogers <i>et al.</i> , 2014)	BAL/ETA/sputum	-	92	Věk: 3,5 let TBSA: 30 % Muži: 54/92	VAP Pneumonie
	(Gülhan <i>et al.</i> , 2020)	Krevní kultura	2 pacienti, 4,9 %	41	Věk: 3 (1,7 – 6,1) let BSA: 24,1 ± 14,7 %	seps
Rod Moraxella	(Brusselsaers <i>et al.</i> , 2012)	ETA	n MDR/celkově (%) 0/1 (0 %)	53	Věk: 44 let TBSA: 35,0 % Muži: 33/53 Mechanická ventilace: 17 dní Doba hospitalizace: 34 dní	VAP
	(Rogers <i>et al.</i> , 2014)	BAL/ETA/sputum	-	92	Věk: 3,5 let TBSA: 30 % Muži: 54/92	Pneumonie
<i>Candida albicans</i>	(Liodaki <i>et al.</i> , 2014)	ETA	-	58	Věk: 48,4 ± 18,3 let TBSA: 20,5 ± 20,4 % Muži: 47/58	pneumonie
	(Zhou <i>et al.</i> , 2019)	-	27,03 % případů	39	Věk: 41,9 ± 18,5 let TBSA: 30,7 ± 23,8 % Muži: 34/39	kandidémie
<i>Candida non-albicans</i>	(Liodaki <i>et al.</i> , 2014)	ETA	-	58	Věk: 48,4 ± 18,3 let TBSA: 20,5 ± 20,4 % Muži: 47/58	pneumonie

BAL = bronchoalveolární laváž

BSA = tělesná plocha

ETA = endotracheální aspirát

MDR = odolnost na více léčiv

MRSA = *Staphylococcus aureus* rezistentní na methicilin

MSSA = *Staphylococcus aureus* citlivý na methicilin

TBSA = celková popálená plocha těla

VAP = ventilátorová pneumonie

2.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa patří mezi gramnegativní bakterie a vyskytuje se až v polovině případů s multirezistentními patogeny (Brusselaers *et al.*, 2012; Tanizaki *et al.*, 2012). Tento bakteriální druh je spojen se vznikem zápalu plic (Yamamura *et al.*, 2015). Zvýšený výskyt *P. aeruginosa* je pozorovaný v plicní mikrobiotě u těžkých astmatiků, zatímco u pediatrických pacientů s CS je mikrobiální rozmanitost tohoto bakteriálního druhu snižena (Hahn *et al.*, 2018; Yatera *et al.*, 2018).

Studie ukazují, že mezi nejčastěji izolované bakterie z dolních cest dýchacích patří *P. aeruginosa* společně s *Klebsiella pneumoniae* a *Acinetobacter baumannii* (Lipovy *et al.*, 2011). Kmen *Pseudomonas* je nejčastěji izolovaný kmen z dýchacích cest popálených pacientů, z popálených ran i z krevního oběhu (Costa *et al.*, 2016; Gülhan *et al.*, 2020). *P. aeruginosa* je přítomna jen zřídka během prvního týdne hospitalizace popáleného pacienta. Během prvních 7 dnů představuje výskyt *P. aeruginosa* pouze 8 % všech gramnegativních izolátů (Lachiewicz *et al.*, 2017). Následně se její přítomnost zvyšuje u 55 % pacientů po 28 dnech po přijetí (Corcione *et al.*, 2020; Wanis *et al.*, 2016). Přítomnost *P. aeruginosa* trvale souvisí s poklesem celkové mikrobiální rozmanitosti (van Duin *et al.*, 2016), která je spojena se špatnou funkcí plic (Hahn *et al.*, 2018). Další nemoci asociované s tímto patogenem jsou charakterizovány v tabulce I.

2.3.2 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii patří mezi nejobávanější respirační patogeny (Lipovy *et al.*, 2011). *Acinetobacter* jsou jedny z nejčastěji izolovaných bakteriálních kmenů z popálených ran a *A. baumannii* je považována za původce infekce krevního oběhu u popálených pacientů, speciálně u pediatrických pacientů (Gülhan *et al.*, 2020; van Duin *et al.*, 2016). *A. baumannii* se stejně jako další gramnegativní bakterie objevuje v dýchacích cestách později během hospitalizace popáleného pacienta (van Duin *et al.*, 2016). Patří mezi MDR nefermentující patogeny a je často asociována se vznikem ventilátorové pneumonie nebo vznikem sepse u popálených pacientů s inhalačním traumatem, viz tabulka I.

2.3.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus je hlavní lidský patogen, který má schopnost získat rezistenci na velké množství antibiotik (Lakhundi *et al.*, 2018). Mechanismus rezistence spočívá v alteraci na proteiny vážící penicilin v organismu (Reardon *et al.*, 1998). Dalším mechanismem je produkce biofilmu, díky kterému je patogen schopný adherovat na různé povrchy, včetně zdravotnických prostředků a hostitelské tkáně (Mahmoudi *et al.*, 2019).

S. aureus společně s *P. aeruginosa* patří mezi nejčastěji izolované patogeny z popálenin a společně jsou asociované se vznikem zápalu plic (Mahmoudi *et al.*, 2019; Yamamura *et al.*, 2015). *S. aureus* citlivý (MSSA) a rezistentní (MRSA) na methicilin není spojen se zvýšenou morbiditou nebo mortalitou u pacientů s popáleninami a populace v tomto případě vykazuje podobné parametry (Reardon *et al.*, 1998). *S. aureus* u popálených pacientů s inhalačním traumatem je asociován se vznikem sepse, VAP a infekčních komplikací, viz tabulka I. Přítomnost tohoto patogenu v dýchacích cestách v průběhu hospitalizace popálených pacientů postupně klesá (Lipovy *et al.*, 2011).

2.3.4 Další bakteriální druhy asociované s inhalačním traumatem

Haemophilus influenzae je přítomna během prvního týdne hospitalizace popáleného pacienta, následně se její výskyt snižuje. V průměru byla izolována od 36 % popálených pacientů během prvního týdne hospitalizace a během dalších 7 dnů poklesla na nulu (Corcione *et al.*, 2020; Lachiewicz *et al.*, 2017). Pomocí ETA bylo zjištěno, že *H. influenzae* je asociován s výskytem VAP a pneumonie u popálených pacientů s inhalačním traumatem, viz tabulka I (Brusselaers *et al.*, 2012; Rogers *et al.*, 2014).

Klebsiella pneumoniae je nejběžnějším izolátem u popálených pacientů, u kterých se rozvinula VAP, viz tabulka I. Tato gramnegativní bakterie se vyskytovala později během hospitalizace popáleného pacienta (Costa *et al.*, 2016).

2.3.5 Rod *Candida*

Rod *Candida* zastupují všudy přítomné lidské komenzální houby, které v případě snížené rezistence hostitele na infekci mohou být příčinnou patologie. Mezi dva nejčastější kvasinkové druhy vyskytující se u popálených pacientů patří *C. parapsilosis* a *C. albicans*. Rizikové faktory pro kandidové infekce u těchto pacientů je prodloužená doba antimikrobiální terapie, léčba steroidy, tracheální intubace a inhalace kouře. Kandidová infekce se může objevit 1-3 týdny po tepelném poranění, včasné rozpoznání a léčba těchto infekcí antifungální terapií může vést ke snížení morbidity a mortality spojené s těmito infekcemi u pacientů s popáleninami. Detekce *Candida* v bronchiálních sekrecích je projevem obecného snížení tělesné odolnosti, při které jsou sníženy antimikrobiální a antimykotické obranné mechanismy. Identifikace *Candida* na úrovni druhů obvykle vyžaduje 1 až 3 dny po detekci růstu hub v kulturách (Wei-hua *et. al.*, 2012).

2.4 Antimikrobiální terapie u pacientů s inhalačním traumatem a infekčními komplikacemi

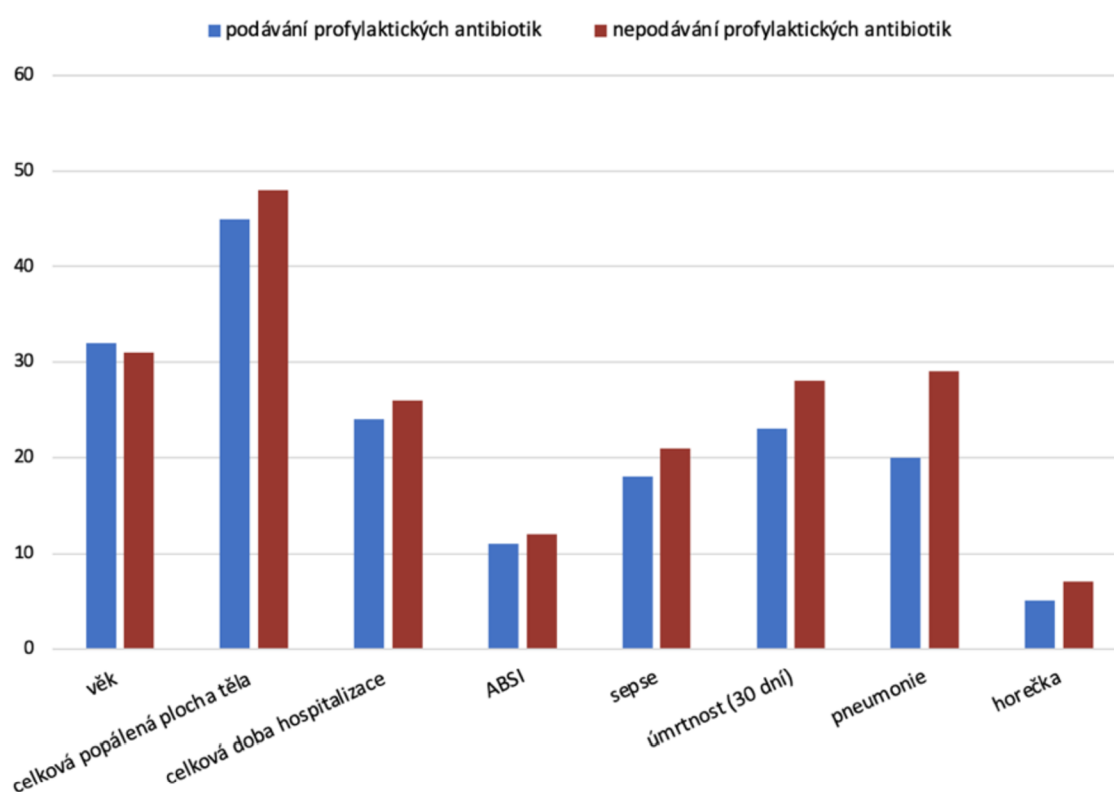
Citlivost stanovení bakteriální rezistence na antibiotika u gram pozitivních i gram negativních bakterií se provádí pomocí diskové difúzní metody a ve vybraných případech se citlivost stanovuje metodou minimální inhibiční koncentrace (MIC) (Gülhan *et al.*, 2020; Lipovy *et al.*, 2011). V průběhu terapie pacientů s inhalačním traumatem se některé mikroorganismy mohou stát rezistentní na určité druhy léčiv. Zvyšující se výskyt těchto mikroorganismů představuje velký problém související s delší dobou účinné léčby, zvýšenou úmrtností, delší dobou hospitalizace i s většími náklady na léčbu (van Duin *et al.*, 2016).

V případě podezření na infekci gram pozitivními bakteriemi je zahájena léčba vankomycinem, zatímco u gram negativní infekce jsou popálení pacienti léčeni meropenem nebo ceftazidimem (Tanizaki *et. al.* 2012).

Vzhledem k tomu, že původci infekčních komplikací jsou i kvasinky *C. albicans* a *C. non-albicans*, tak je terapie zahájena intrakonazolem, vorikonazolem nebo dalšími azoly (Wei-hua *et. al.*, 2012).

Podávání profylaktických antibiotik je stále tématem kontroverze. Neexistují žádná jasná doporučení a je pouze na zkušenostech ošetřujících lékařů, aby si vybrali, které profylaktické antibiotikum použijí, pokud vůbec nějaké (Lipovy *et al.*, 2011; Muthukumar *et al.*, 2020).

O podávání profylaktických antibiotik se dá uvažovat ve speciálních případech, například u pacientů s inhalačním traumatem nebo rozvíjející se pneumonií (Muthukumar *et al.*, 2020). Výsledný vliv podávání profylaktických antibiotik je znázorněn na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: Podávání profylaktických antibiotik u pacientů s inhalačním traumatem. Popálení pacienti s inhalačním traumatem ze skupiny, které byla podávána profylaktická antibiotika (n=30) měli průměrný pobyt v nemocnici 24 dní, sepsis byla pozorována u 18 pacientů, pneumonie byla diagnostikována u 20 pacientů a 22 pacientů nepřežilo do 30. dne po utrpění popálení. Ve skupině pacientů s inhalačním traumatem, kterým nebyla podávána profylaktická antibiotika (n=38) byl průměrný pobyt v nemocnici 26 dní, sepsis byla pozorována u 21 pacientů, pneumonie byla diagnostikována u 29 pacientů a 27 pacientů nepřežilo do 30. dne po popálení (Muthukumar *et al.*, 2020, upraveno)

3 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je zpracovat literární rešerši k problematice mikrobioty (bakterií a kvasinek) u pacientů s inhalačním traumatem.

Dalším cílem je zavedení izolační metody pro následnou sekvenační analýzu mikrobiomu (bakteriomu, mykobiomu) ve vzorcích od těchto pacientů.

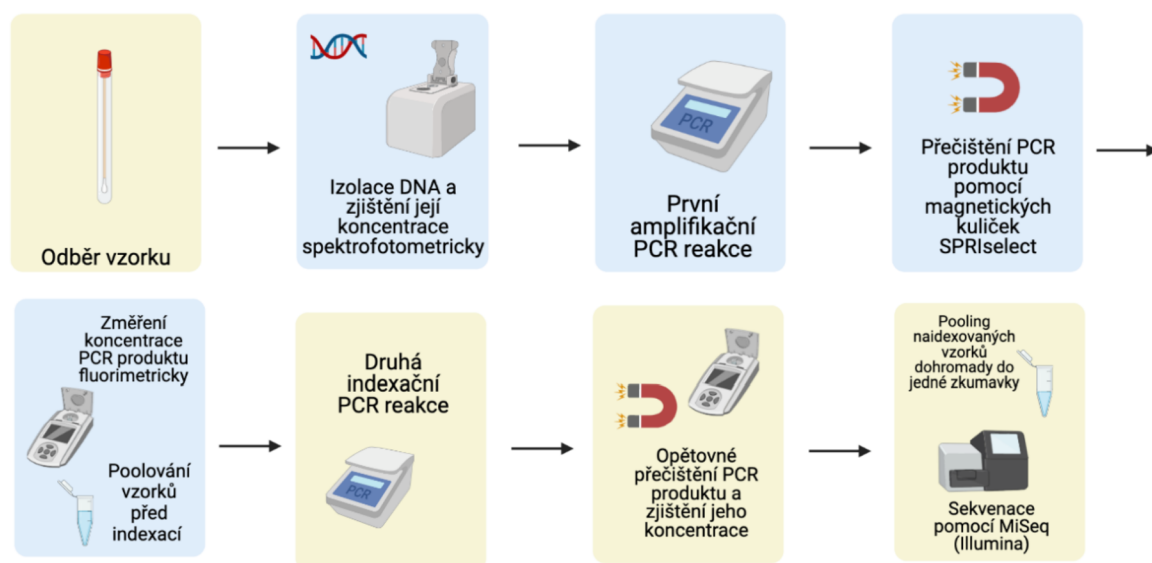
4 Praktická část

4.1 Materiál a metody

V rámci praktické části této bakalářské práce byly zpracovány vzorky stěrů z bukální sliznice a stěrů z nosohltanu 3 popálených pacientů, kteří utrpěli inhalační trauma. V rámci projektu Molekulárně genetická analýza dynamických změn mikrobiomu dýchacích cest u pacientů s inhalačním traumatem – Startup Fakultní nemocnice Brno, byly vzorky získány od hospitalizovaných pacientů na Klinice popálenin a plastické chirurgie Fakultní nemocnice Brno pod vedením doc. MUDr. Břetislava Lipového, PhD., MBA.

Vzorky byly odebrány pomocí tamponu FLOQSwabs (COPAN, Itálie) z levé a pravé strany bukální sliznice a z nosohltanu, a to 1., 3., 5., 7., 14. a 28. den hospitalizace pacienta. Vzorky byly do 1 hodiny od odběru uskladněny při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro testování bylo použito 8 vzorků od jednoho pacienta, a to odběry z pravé bukální sliznice (BP) a z pravého nosohltanu (OP) odebraných ve dnech 1, 3, 7 a 14.

Jednotlivé kroky následujícího postupu práce vychází ze standardních operačních postupů (SOP), které byly zavedeny v laboratoři pro analýzu mikrobiomu RECETOX, PŘF MU v Brně, kde byla praktická část bakalářské práce provedena. Knihovna a následné sekvenování nové generace bylo připraveno dle standardního Illumina 16S metagenomického protokolu s drobnými modifikacemi. Na obrázku č. 5 je schéma odběru a zpracování vzorků a jednotlivé kroky jsou podrobně popsány níže. Světle modré podbarvení představuje práci v laboratoři, na které jsem se podílela. Zpracování vzorků po prvním poolování bylo provedeno RNDr. Petrou Šplíchalovou, Ph.D.



Obrázek č. 5: Work-flow graf znázorňující odběr a zpracování vzorků. Vytvořeno pomocí BioRender.com.

4.1.1 Izolace DNA a kontrola kvality gDNA

DNA byla ze vzorků izolována pomocí komerční soupravy QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Německo). Ke vzorkům bylo po rozmražení přidáno 400 μ l ATL pufru a 20 μ l proteinázy K. Následně byly vzorky zvortexovány a stočeny na centrifuze a inkubovány na třepačce po dobu 1 hodiny a 20 minut při 800 rpm a teplotě 56 °C. Dále byly vzorky krátce stočeny a bylo k nim přidáno 5 μ l ribonukleázy (RNáza, 25 μ g/ml), následně byly vortexovány po dobu 15 sekund a inkubovány po dobu 2 minut při pokojové teplotě.

Po krátkém stočení na centrifuze bylo přidáno 200 μ l pufru AL. Vzorky byly zvortexovány a inkubovány při 70 °C po dobu 10 minut při 800 rpm. Ke vzorkům bylo přidáno 200 μ l absolutního ethanolu, následně byly vzorky zvortexovány po dobu 15 sekund a krátce stočeny.

Odběrové tampóny byly přeneseny do nových zkumavek a byly centrifugovány cca 3,5 minuty při 16 000 g. Získaný pelet byl přidán do první izolační zkumavky a na Spin Column bylo nanášeno 675 μ l supernatantu. Vzorky byly centrifugovány po dobu 1 minuty při 6 000 g. Tekutina, která protekla, byla odstraněna. Nanášení supernatantu na Spin Column a centrifugování bylo stejným způsobem ještě jednou zopakováno, aby došlo k nanášení veškerého supernatantu.

Na promytí kolonky bylo využito 500 μ l pufru AW1 a izolační zkumavky byly centrifugovány po dobu 1 minuty při 6 000 g. Spin Column byla přenesena do nové Collection tube a bylo přidáno 500 μ l pufru AW2, následně byly vzorky centrifugovány po dobu 1 minuty při 16 000 g. Spin Column byla znovu přenesena do nové zkumavky, vzorky byly centrifugovány po dobu 3 minut při 16 000 g a roztok, který protekl, byl odstraněn.

Pro eluci DNA byla Spin Column přenesena do nové zkumavky a do středu filtru bylo nanášeno 32,5 μ l elučního roztoku AE nahřátého na 65 °C. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě 5 minut a centrifugovány 1 minutu při 6 000 g. Získaný roztok s eluovanou DNA, byl znovu nanášen na filtr, inkubován a centrifugován za stejných podmínek. Spin Column byla odstraněna a zkumavky se získanou genomovou DNA (gDNA) byly skladovány při 4 °C a pro provedení kontroly kvality byly zamrazeny na -20 °C. Všechny výše uvedené postupy jsou znázorněny na obrázku č. 6.



Obrázek č. 6: Schéma znázorňující izolaci DNA (QIAGEN 2016, upraveno).

V průběhu izolace DNA byl využit AL pufr, který obsahuje chaotropní sůl a vytváří vazbu zároveň se záporně nabitým sklem v kolonce i se záporně nabitou DNA. Molekuly DNA v přítomnosti chaotropních solí adherují na SiO₂ a dochází k jejich zachycení na kolonce, v případě, že by molekuly DNA neadherovaly na SiO₂, nedošlo by k jejich zachycení. Vlivem solí a pH lyzátu nedochází k zadržování bílkovin a dalších kontaminujících látek, které by mohly inhibovat PCR reakci a další enzymatické reakce (QIAGEN, 2016).

V praktické části bakalářské práce byly ke změření koncentrace využity přístroje Nanodrop a Qubit HS. Nanodrop funguje na spektrofotometrickém principu, zatímco Qubit HS funguje na fluorimetrickém principu. Spektrofotometr měří vše, co absorbuje světlo při 260 nm (jedno/dvouvláknové DNA, RNA, proteiny nebo kontaminující látky) a často výsledné koncentrace dosahují vyšších hodnot právě kvůli kontaminaci (O'Neill *et al.*, 2011). Měření vyžaduje menší objem vzorku (Khanna *et al.*, 2016; O'Neill *et al.*, 2011). Fluorimetr je založen na principu fluorescence barviv a tím pádem obsahuje citlivá barviva, která fluoreskují v poměru množství proteinu, RNA nebo DNA (O'Neill *et al.*, 2011). Na rozdíl od spektrofotometru rozlišuje dvouvláknovou DNA (Khanna *et al.*, 2016). Nevýhodou představuje nemožnost změřit přesnou čistotu vzorku (O'Neill *et al.*, 2011).

Pro kontrolu kvality gDNA byla využita spektrofotometrická metoda měření koncentrace DNA pomocí Nanodropu: microplate reader (Synergy Mx, BioTek, USA). Na destičku bylo napipetováno 2 µl standardu (tzv. blanku) a po 2 µl každého vzorku na destičku. Jako blank byl použit eluční roztok AE. Uzavřená destička byla vložena do Synergy HTX fluorimetru a pomocí zařízení byla vyhodnocena kalibrační křivka a poměry hodnot A_{260}/A_{230} a A_{260}/A_{280} pro posouzení čistoty vzorků.

Kromě spektrofotometrického ověření byla provedena i gelová elektroforéza. Při přípravě 1 % agarózového gelu bylo použito interkalační činidlo – RED gel (Biotium), pro zviditelnění DNA v UV záření. Objemy agarózového roztoku potřebného pro přípravu 1 % a 1,5 % agarózového gelu závisící na velikosti tácu jsou uvedeny v tabulce II. Po smíchání agarózového prášku a roztoku TAE bylo nutné směs zahřát v mikrovlnné troubě až do doby, než došlo k rozpuštění všech krystalů. Do zchlazeného roztoku bylo následně přidáno dané množství RED gelu podle tabulky II. Před naléváním byl roztok zchlazen na teplotu v rozmezí 50 °C až 60 °C. Takto zchlazený gel bylo možné přelit do tácu a následně

vložit hřebeny do jamek. Po ztuhnutí gelu byly hřebeny odstraněny a gel vložen do elektroforetické vany. Do jamek byly napipetovány vzorky o objemu 5 μl , které byly smíchány s nanášecím pufrem. Do jedné z jamek byl napipetován 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs), který slouží pro odhad velikosti separovaných fragmentů nukleových kyselin. Zařízení bylo připojeno ke zdroji napájení na 100 V po dobu 35 minut. Pro vyfocení výsledků na gelu bylo použito UV zobrazovací zařízení Azure c200 (Azure Biosystems).

Tabulka II: Navážky a objemy chemikálií potřebných pro přípravu agarózových gelů

Velikost tácu	Objem TAE (ml)	Váha aragózy (g)	Objem RED gelu (μl)	% gelu
40	40	0,4	2	1,0
65	65	0,65	3	
200	200	2	9	
350	300	3	14	
40	40	0,6	2	1,5
65	65	0,975	3	
200	200	3	9	
350	300	4,5	14	

4.1.2 První kolo amplifikace 16S rRNA

První kolo amplifikace cílí na hypervariabilní oblast 16S genu, čímž dojde k amplifikaci mikrobiální DNA. Pro první kolo amplifikace 16S rRNA byla použita polymeráza Q5 High-Fidelity 2x Master Mix (BioLabs) (polymeráza je součástí mastermixu). Reakční směs na PCR měla celkový objem 30 μl a reagentie, které byly použity v PCR reakci, jsou shrnuty v tabulce III. Dané parametry jednotlivých kroků a počet cyklů jsou shrnuty v tabulce IV. Amplifikace 16S rRNA probíhala na přístroji Mastercycler GSX1 (Eppendorf). Pro pozitivní kontrolu byla použita lidská DNA a pro negativní kontrolu byla použita deionizovaná voda. V případě, že by vyšla pozitivní kontrola negativně, znamená to, že byla provedena chyba v průběhu elektroforézy nebo při přípravě gelu, například kdybychom zapomněli přidat RED gel (Biotium). V případě, že by vyšla negativní kontrola pozitivně, jednalo by se o kontaminaci reagentů, například mastermixu nebo primerů a naše vzorky by se nedaly považovat za průkazné.

Tabulka III: Složení reakční směsi pro polymerázovou řetězovou reakci

Reagencie	Objem (μ l)
Q5 High-Fidelity 2x Master mix (BioLabs, New England)	15
H ₂ O	9
EMP forward primer	1,5
EMP reverse primer	1,5
DNA	3

Tabulka IV: Program polymerázové řetězové reakce

Jednotlivé kroky	Parametry		Počet cyklů
Počáteční denaturace	98 °C	30 sec	1
Denaturace	98 °C	10 sec	
Dosednutí primerů	55 °C	15 sec	30
Extenze	72 °C	30 sec	
Syntéza DNA	72 °C	2 min	1
Chlazení	4 °C	∞	1

Pro amplifikaci genu 16S rRNA byly použity primery 16S Earth microbiome Project (EMP) (Walters *et al.*, 2016), jejichž oligonukleotidové sekvence jsou uvedeny v tabulce V.

Primery se skládají z několika částí:

- Overhang (extenze) – oblast potřebná pro následné nasedání indexů
- Značka – sekvence odlišující od sebe jednotlivé vzorky
- Spacer – odděluje značku od oblasti komplementární k oblasti zájmu
- Vlastní primer – komplementární k oblasti zájmu

Byly využity značené primery (barcode), které jsou PCR reakcí včleněny do naamplifikovaných úseků. Kvůli odlišným barcodům mohou být vzorky zpoolovány před indexační PCR reakcí a tyto značky umožňují sekvenovat více vzorků najednou a na jejich základě je odlišit.

Tabulka V: Primery s oligonukleotidovými sekvencemi

Primer	Extenze	Sekvence vlastního primeru
16S EMP forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	CCTACGGGNGGCWGCAG
16S EMP reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	GACTACHVGGGTATCTAATCC

4.1.3 Kontrola kvality po amplifikaci

Kontrola kvality PCR produktů po amplifikaci proběhla pomocí gelové elektroforézy. Provedení bylo stejné jako při výše popsaném postupu v kapitole 4.1.1. s tím rozdílem, že byl využit 1,5 % agarózový gel s RED gelem podle tabulky II a 2 μ l vzorku a 2 μ l loading bufferu. Do jedné z jamek byl napipetován 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs). Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji napájení po dobu 35 minut na 100 V. Pro zachycení výsledků na gelu bylo využito UV zobrazovací zařízení Azure c200 (Azure Biosystems).

4.1.4 PCR Clean up

Přečištění PCR produktů od zbylých primerů, polymerázy a neinkorporovaných nukleotidů bylo následně provedeno pomocí paramagnetických kuliček SPRIselect beads (Beckman Coulter Genomics). Do stripů bylo přeneseno 25 μ l amplikonů a do každé jamky bylo přidáno 20 μ l zvortexovaných SPRIselect beads (Beckman Coulter Genomics). Destičku bylo nutné zalepit a dát na 2 minuty na třepačku na 1800 rpm. Po stočení byly vzorky inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Destička byla položena na magnetický stojánek do doby než se projasnil supernatant, který byl následně odstraněn. Poté proběhlo první promytí. Do každé jamky bylo napipetováno 180 μ l 80 % ethanolu, vzorky se

nechaly inkubovat na stojánku po dobu 30 s a následně byl odstraněn supernatant. Druhé promývání proběhlo stejným způsobem. Každá jamka byla opět promyta 180 μ l 80 % ethanolem a inkubována po dobu 30 s. Vzniklý supernatant byl opatrně odpipetován a zkumavky byly inkubovány při laboratorní teplotě až do odpaření veškerého ethanolu. Poté byla destička sundána ze stojánku a do jamek bylo přidáno 32.5 μ l TE pufru. Destička byla zalepena a dána na 2 minuty na třepačku na 1800 rpm. Následně byla destička inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 minut a poté byla vrácena na magnetický stojánek a znovu inkubována až do doby, než se supernatant projasnil. Do nového stripu bylo odpipetováno 30 μ l supernatantu, ve kterém se nachází přečištěné amplikony.

4.1.5 Kontrola kvality PCR produktů po přečištění

Po přečištění pomocí SPRIselect paramagnetických kuliček následovala kontrola kvality DNA pomocí gelové elektroforézy, která probíhala stejným způsobem jako kontrola kvality amplikonů po prvním kole PCR, viz kapitola 4.1.3.

4.1.6 Měření koncentrace přečištěných PCR produktů

K měření koncentrace přečištěných PCR produktů byl použit Quant-iT dsDNA Assay Kit (Invitrogen™, USA). Ve sterilní plastové zkumavce bylo smícháno Quant-it dsDNA reagent a Quant-it pufru v poměru 1:199 μ l. Jedná se o množství pro jeden vzorek, který byl vynásoben počtem vzorků s připočítáním 10 % navíc. Dále tento roztok rozpipetováváme po 198 μ l do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky. Vzorky byly pipetovány ob jeden sloupec. Do jamek určených pro standardy bylo pipetováno 190 μ l. Do každé jamky byly k roztoku postupně pipetovány 2 μ l vzorku nebo 10 μ l standardu, které byly před pipetováním lehce zcentrifugovány. Celá směs v jamkách byla promíchána pipetou a byly vytvořeny duplikáty do zbývajících volných sloupců. Výsledný objem v jamkách byl tedy 100 μ l. Destička byla přelepena folií, stočena a následně došlo ke změření koncentrace DNA fluorimetricky pomocí přístroje Qubit HS. Získané hodnoty se mohly mezi duplikáty lišit maximálně o 10 %, jinak bylo nutné měření zopakovat.

4.1.7 Poolování vzorků před indexací

Vzorky s označenými primery byly ekvimolárně smíchány (tzv. poolování) do jedné zkumavky, a to díky použití EMP1-EMP8 primerů při amplifikaci 16S rRNA. Pro tento pool byla zvolena koncentrace 15 ng. Vzniklé pooly posloužily jako templát pro indexační PCR reakci. Takto připravené pooly byly předány k dalšímu zpracování RNDr. Petře Šplíchalové, Ph.D.

4.1.8 Následující zpracování vzorků

V dalších krocích byla provedena indexační PCR reakce s použitím Nextera XT indexů (Illumina, USA). Indexační PCR reakce probíhala s menším množstvím cyklů, než bylo použito u klasické PCR reakce. Kontrola kvality byla uskutečněna pomocí gelové elektroforézy s využitím 1,5 % agarózového gelu s RED gelem. Jako velikostní marker byl použit 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs). Přečišťování produktů probíhalo ve stripech pomocí magnetických kuliček totožně jako v kroku 4.1.4. Dále se využilo fluorimetrické stanovení koncentrace přečištěných PCR produktů. Oindexované pooly byly kvantifikovány pomocí qPCR KAPA Library Quantification Complete Kit (Roche, USA) a přístroje LightCycler 480 Instrument (Roche, USA), kde došlo ke kontrole velikosti fragmentů. Na základě výsledků qPCR byly pooly ekvimolárně smíchány do finální knihovny. Vzniklá knihovna byla zkontrolována na přístroji 2100 Bioanalyzer Instrument za použití kitu High Sensitivity D1000 Screen Tape (Agilent Technologies, USA), změřila se u ní koncentrace pomocí microplate reader dsDNA HS Assay Kit a stanovila se koncentrace knihovny pomocí KAPA Library Quantification Kit. Samotná sekvenace probíhala na přístroji MiSeq sekvenátoru (Illumina, USA) dle zvoleného návodu. Finální knihovna byla naředěna na koncentraci 8 pM a bylo k ní přidáno 20 % PhiX (Illumina, USA), který sloužil jako kontrola. Následně byly vzorky předány k bioinformačnímu zpracování a ke statistické analýze.

4.2 Výsledky

Byla zoptimalizovaná metodika pro zpracování vzorků stěrů z bukální sliznice a stěrů z nosohltanu a zavedena izolační metodika pro následnou sekvenční analýzu bakteriomu.

4.2.1 Izolace DNA a kontrola kvality gDNA

Z 8 vzorků bylo získáno celkem 32,5 μl gDNA. Koncentrace izolované gDNA společně s její čistotou jsou uvedeny v tabulce VI, kontrola DNA po izolaci viz obrázek č. 7. Koncentrace gDNA se pohybovala v rozmezí 10-44 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

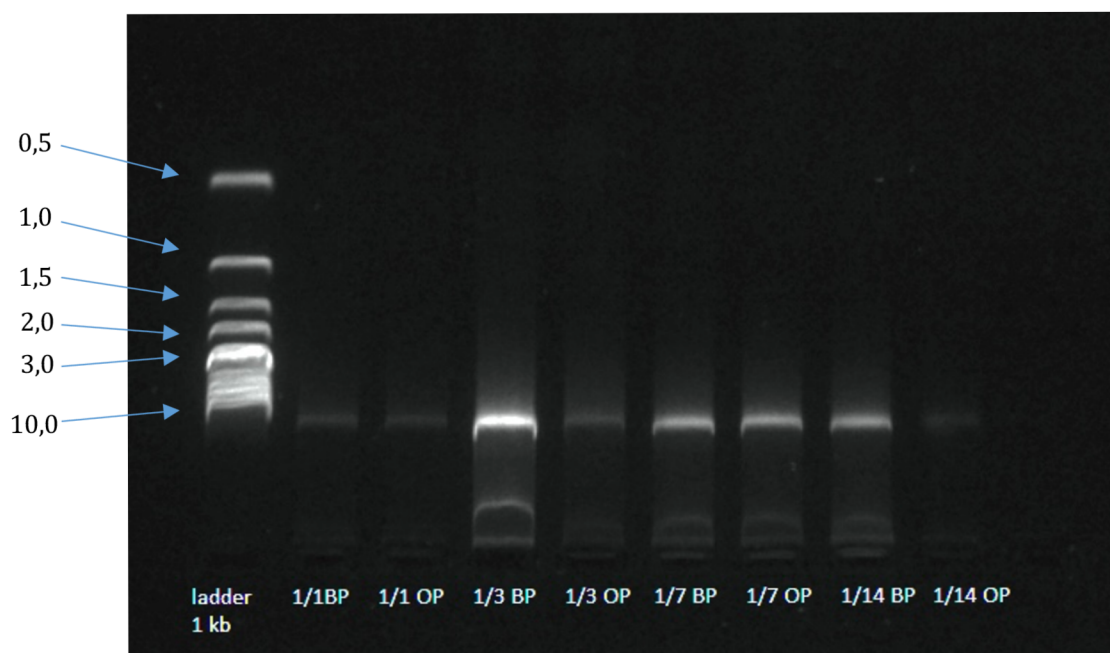
Tabulka VI: Tabulka shrnující naměřené koncentrace izolované gDNA ze stěrů bukální sliznice a ze stěrů z nosohltanu po dobu hospitalizace pacienta s inhalačním traumatem.

Název	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Koncentrace ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
1/1 BP	2,16	0,71	10,38
1/1 OP	2,50	0,61	9,78
1/3 BP	1,89	1,52	44,38
1/3 OP	1,94	1,26	17,10
1/7 BP	1,99	1,06	21,34
1/7 OP	2,05	1,335	21,37
1/14 BP	2,08	0,856	20,48
1/14 OP	2,09	0,853	15,35

BP – bukální sliznice pravá

OP – nosohltan pravý

X/Y – pacient/den odběru



Obrázek č 7: Vyfocená gelová elektroforéza sloužící ke kontrole kvality gDNA po izolaci ze vzorků stěrů bukální sliznice a ze stěrů z nosohltanu.

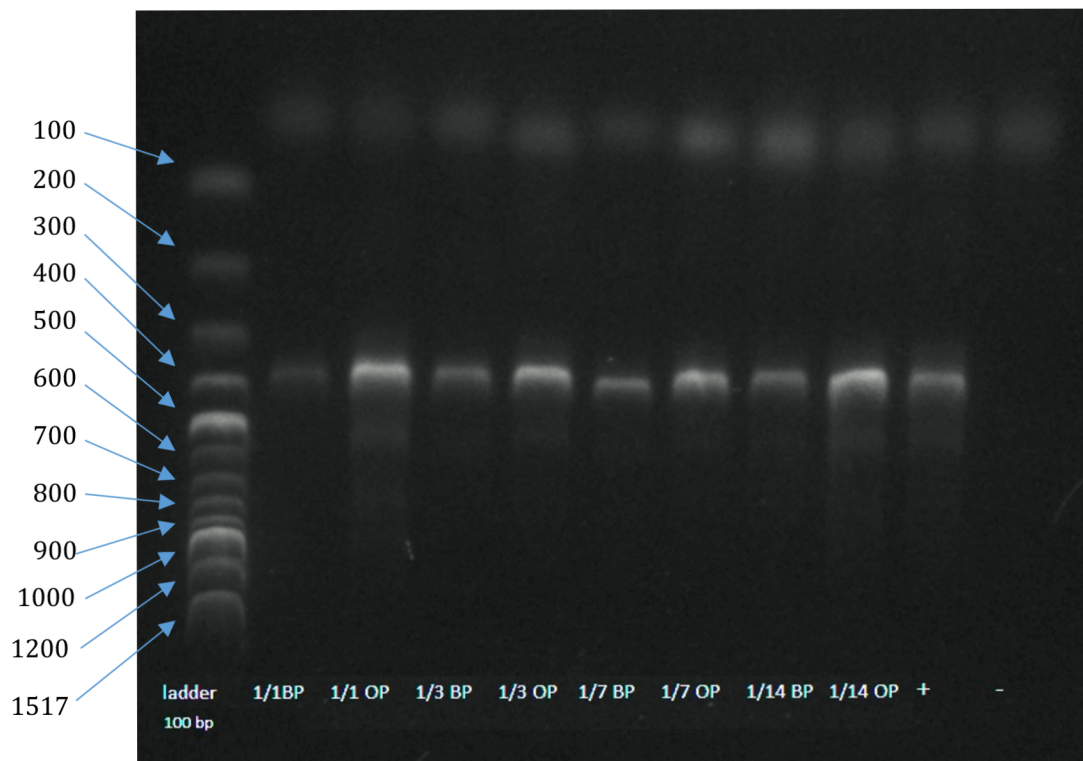
BP – bukální sliznice pravá

OP – nosohltan pravý

X/Y – pacient/den odběru

4.2.2 Kontrola kvality po amplifikaci

PCR cílenou na hypervariabilní oblasti 16S genu byly namnoženy amplikony. Na obrázku č. 8 je vyfocena gelová elektroforéza na 1,5 % agarózovém gelu s využitím RED gelu (Biotium).



Obrázek č 8: Výsledek gelové elektroforézy po amplifikaci vzorků stěrů bukální sliznice a stěrů z nosohltanu. Jako velikostní marker byl použit Ladder 100 bp (New England BioLabs). Na fotografii gelu je zachycena pozitivní i negativní kontrola.

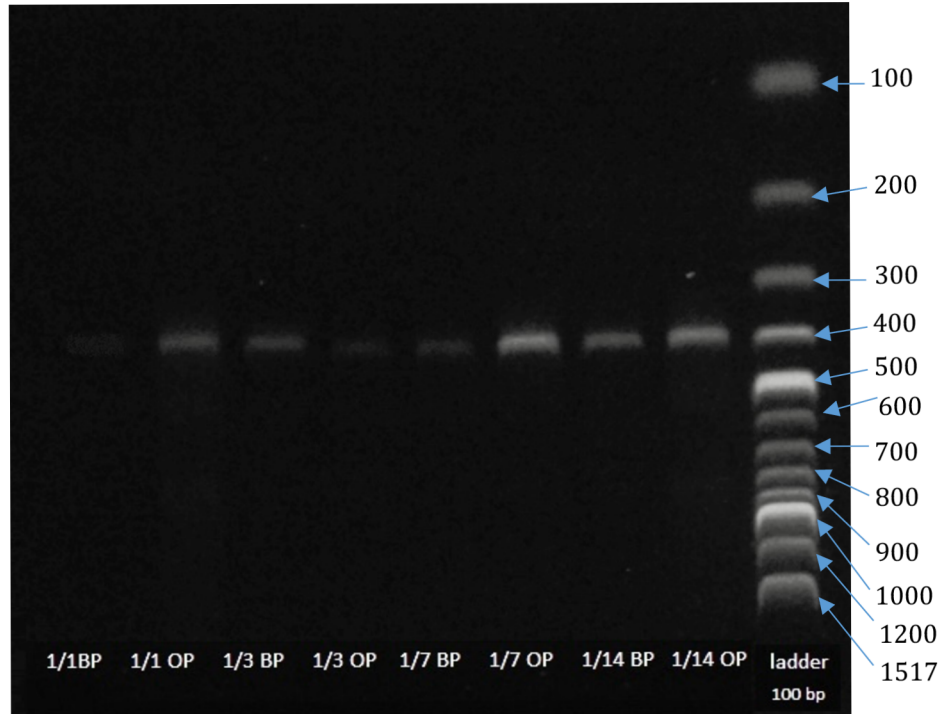
BP – bukální sliznice pravá

OP – nosohltan pravý

X/Y – pacient/den odběru

4.2.3 PCR Clean up

Přečištění bylo úspěšné, viz obrázek č. 9.



Obrázek č. 9: Výsledek gelové elektroforézy po přečištění amplikonů. Na pravé straně je umístěn 100 bp velikostní marker (New England BioLabs).

BP – bukální sliznice pravá

OP – nosohltan pravý

X/Y – pacient/den odběru

4.2.4 Měření koncentrace přečištěných PCR produktů

Výsledné koncentrace jsou uvedeny v tabulce VII.

Tabulka VII: Výsledné koncentrace přečištěných PCR produktů. Pokud je rozdíl menší než 10 % z průměru, tak se měření nemusí opakovat.

Název	Průměr (ng/μl)	10 % z průměru (ng/μl)	Rozdíl	Koncentrace po přečištění (ng/μl)
1/1 BP	3551,5	355,15	17	1,62
1/1 OP	14487	1448,7	200	6,62
1/3 BP	9680,5	968,05	575	4,42
1/3 OP	9851,5	985,15	3	4,5
1/7 BP	7175,5	717,55	23	3,27
1/7 OP	22133,5	2213,35	35	10,11
1/14 BP	9413,5	941,35	295	4,3
1/14 OP	17450	1745	582	7,97

BP – bukalní sliznice pravá

OP – nosohltan pravý

X/Y – pacient/den odběru

4.2.5 Poolování vzorků před indexací

V tabulce VIII. jsou uvedeny výsledné koncentrace, podle kterých byl vytvořen pool. Výsledný objem byl 29,74 μl.

Tabulka VIII: Souhrnná tabulka s výslednými koncentracemi gDNA po izolaci, přečištění a daty k poolování.

Název	Koncentrace gDNA, Nanodrop (ng/μl)	Ředění DNA	EMP primery	Koncentrace, fluorimetr (ng/μl)	Poolování vzorků na 15 ng (μl)
1/1BP	10,38	-	EMP1	1,62	9,30
1/1OP	9,78	-	EMP2	6,62	2,27
1/3BP	44,38	10x	EMP3	4,42	3,40
1/3OP	17,10	-	EMP4	4,5	3,34
1/7BP	21,34	-	EMP5	3,27	4,59
1/7OP	21,37	-	EMP6	10,11	1,48
1/14BP	20,48	-	EMP7	4,3	3,49
1/14OP	15,35	-	EMP8	7,97	1,88

BP – bukalní sliznice pravá

OP – nosohltan pravý

X/Y – pacient/den odběru

4.3 Diskuse

Z teoretické části této bakalářské práce vyplývá, že mikrobiota (bakteriomi a mykobiomi) je významným hráčem v patogenezi komplikací spojených s inhalačním traumatem. Podle uvedených studií bylo zjištěno, že nejčastější mikroorganismy asociované s inhalačním traumatem jsou: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia* a zástupce rodu *Candida*. Studie se ovšem lišily v charakterizované populaci, a to z hlediska velikosti zkoumané populace, věku, celkové popálené plochy těla, počtu dní na mechanické ventilaci, celkové doby hospitalizace a pohlaví pacientů. Dalším zkoumaným parametrem byla multirezistence daných organismů a způsob odběru mikrobiologického materiálu pro kultivaci (BAL, ETA, sputum, krevní kultura). Vhodná frekvence odběrů by měla být pro prokazatelné výsledky prováděna alespoň dvakrát týdně (Brusselaers *et al.*, 2012).

Nejčastěji jsou uvedené mikroorganismy asociovány s rozvojem ventilátorové pneumonie (VAP), která patří mezi nozokomiální infekce získané na jednotce intenzivní péče během mechanické ventilace (Brusselaers *et al.*, 2012; Spalding *et al.*, 2020). Mezi další sekundární komplikace spojené s uvedenými mikroorganismy bylo riziko vzniku pneumonie, sepse a infekčních komplikací spojených s respiračním traktem.

Bylo prokázáno, že grampozitivní organismy (*S. aureus*, *S. pneumoniae*) jsou izolovány z dýchacích cest popálených pacientů dříve, zatímco gramnegativní organismy (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*) později během hospitalizace těchto pacientů. Důkladné pochopení bakteriální flóry může přispět ke kontrole mikrobiomu a v blízké budoucnosti přispět k léčbě plicních nemocí (Yatera *et al.*, 2018).

Vývoj plísňových infekcí v posledních letech vzrostl a tyto infekce představují riziko na jednotkách intenzivní péče. Rozvoj plísňové infekce je spojován s bakteriální infekcí a užíváním antibiotik. Popáleniny představují důležitý a nezávislý rizikový faktor pro invazivní houbovou infekci. Je třeba vzít v úvahu možnost, že u pacientů s popáleninami může dojít k nástupu infekce po delší době hospitalizace. U popálených pacientů dochází k agresivní a invazivní infekci plísněmi rodu *Candida*, *Aspergillus* a *Zygomycetes* (Wei-hua *et al.*, 2012).

V praktické části byla průměrná koncentrace izolovaných DNA $20,02 \pm 10,16$ ng/ μ l, viz tabulka VI. Rozdíly mezi výslednými koncentracemi mohly být způsobeny pipetovací chybou nebo při odběru vzorků tampónem, tzn. nemuselo být odebráno dostatečné množství vstupního materiálu. Naproti tomu jsme nepozorovali rozdíly mezi koncentrací DNA izolované z oblasti bukální sliznice a nosohltanu. Když porovnáme koncentrace z Nanodropu s intenzitou bandů na fotografii agarózového gelu (obrázek č. 7), jde vidět, že koncentrovanější vzorky jsou vidět lépe než ty s koncentrací nižší.

V tabulce VI jsou uvedeny poměry absorbancí vlnových délek A_{260}/A_{230} a A_{260}/A_{280} , které mohou značit čistotu či kontaminaci vzorků. Výsledný poměr absorbancí při vlnových délkách A_{260}/A_{280} by měl být vyšší než 1,8, neboť v případě nižších hodnot se jedná o kontaminaci proteiny. Naše vzorky dosahují hodnot 1,9 – 2,5, jsou tedy vyšší než 1,8, což znamená, že nejsou kontaminované proteiny. Výsledný poměr absorbancí vlnových délek A_{260}/A_{230} by měl být průměrně vyšší než 1,8. Naše vzorky dosahují hodnot 0,6 – 1,5. Znamená to tedy, že jsou kontaminované organickými látkami. V dalším krocích dochází k přečištění kontaminovaných vzorků.

Izolace byla úspěšná, jelikož jsme získali DNA ze všech vzorků a mohla být nadále použita. Následná kontrola kvality po amplifikaci byla též úspěšná, protože všechny bandy jsou na fotografii agarózového gelu dostatečně viditelné (obrázek č. 8). Pozitivní kontrola zachycena na fotografii vyšla pozitivně, tzn. amplikony obsahovaly požadované množství DNA. Negativní kontrola není na agarózovém gelu vidět, tzn. amplikony nebyly kontaminované. Výsledné amplikony se mohly použít k dalším krokům.

Přečištění PCR produktů bylo úspěšné, protože na fotografii agarózového gelu (obrázek č. 9) jsou vidět všechny bandy, i ty s nižší koncentrací. Nejvyšší naměřená koncentrace u přečištěných PCR produktů byla 10,11 ng/ μ l a nejnižší byla 1,61 ng/ μ l. Měření probíhalo v duplikátech, mezi kterými nesměl být rozdíl větší než 10 %. V případě našich vzorků se duplikáty více jak o 10 % nelišily, tudíž nebylo nutné opakovat měření fluorescence. Podle tabulky VIII. Pool vzorků byl předán k dalším krokům a bioinformatické analýze.

5 Závěr

Z rešerše publikovaných vědeckých článků vyplývá, že mezi nejčastěji izolované bakteriální a kvasinkové druhy z dýchacích cest u pacientů s inhalačním traumatem patří *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* a zástupce rodu *Candida*.

Byla zavedena izolační metodika pro následnou sekvenační analýzu mikrobiomu (bakteriomu) z 8 vzorků od 3 popálených pacientů trpících inhalačním traumatem. Pomocí izolace bylo získáno 32,5 μ l gDNA. Která byla následně naamplifikována, zpoolována a připravena na sekvenační analýzu.

Cíle této práce byly splněny. Plánem do budoucna je pokračovat ve studiu dynamických změn mikrobioty dýchacích cest u pacientů s inhalačním traumatem.

Použité zdroje

- Al Ashry, H. S., Mansour, G., Kalil, A. C., Walters, R. W., & Vivekanandan, R. (2016). Incidence of ventilator associated pneumonia in burn patients with inhalation injury treated with high frequency percussive ventilation versus volume control ventilation: A systematic review. *Burns*, *42*(6), 1193–1200. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.02.024>
- Avni, T., Levcovich, A., Ad-El, D. D., Leibovici, L., & Paul, M. (2010). Prophylactic antibiotics for burns patients: Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Online)*, *340*(7745), 517. <https://doi.org/10.1136/bmj.c241>
- Barfod, K. K., Roggenbuck, M., Hansen, L. H., Schjørring, S., Larsen, S. T., Sørensen, S. J., & Kroghfelt, K. A. (2013). The murine lung microbiome in relation to the intestinal and vaginal bacterial communities. *BMC Microbiology*, *13*(1), 1471–2180. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-303>
- Beck, J. M., Young, V. B., & Huffnagle, G. B. (2012). The microbiome of the lung. *Translational Research*, *160*(4), 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.02.005>
- Beckmann, N., Pugh, A. M., & Caldwell, C. C. (2018). Burn injury alters the intestinal microbiome's taxonomic composition and functional gene expression. *PLoS ONE*, *13*(10), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205307>
- Brusselaers, N., Logie, D., Vogelaers, D., Monstrey, S., & Blot, S. (2012). Burns, inhalation injury and ventilator-associated pneumonia: Value of routine surveillance cultures. *Burns*, *38*(3), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2011.09.005>
- Charlson, E. S., Bittinger, K., Haas, A. R., Fitzgerald, A. S., Frank, I., Yadav, A., Bushman, F. D., & Collman, R. G. (2011). Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *184*(8), 957–963. <https://doi.org/10.1164/rccm.201104-0655OC>
- Chellappan, D. K., Sze Ning, Q. L., Su Min, S. K., Bin, S. Y., Chern, P. J., Shi, T. P., Ee Mei, S. W., Yee, T. H., Qi, O. J., Thangavelu, L., Rajeshkumar, S., Negi, P., Chellian, J., Wadhwa, R., Gupta, G., Collet, T., Hansbro, P. M., & Dua, K. (2019). Interactions between microbiome and lungs: Paving new paths for microbiome based bio-engineered drug delivery systems in chronic respiratory diseases. *Chemico-Biological Interactions*, *310*(July), 108732. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108732>
- Corcione, S., Lupia, T., & De Rosa, F. G. (2020). Microbiome in the setting of burn patients: implications for infections and clinical outcomes. *Burns & Trauma*, *8*. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkaa033>
- Costa et al. (2016). Face and/or neck burns: A risk factor for respiratory infection? *Annals of Burns and Fire Disasters*, *29*(2), 97–102.
- David J. Dries, & Frederick, E. (2013). Inhalation injury: Epidemiology, pathology, treatment strategies. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, *21*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1757-7241-21-31>
- Dima, E., Kyriakoudi, A., Kaponi, M., Vasileiadis, I., Stamou, P., Koutsoukou, A., Koulouris,

- N. G., & Rovina, N. (2019). The lung microbiome dynamics between stability and exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Current perspectives. *Respiratory Medicine*, 157(August), 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.08.012>
- Dyamenahalli, K., Garg, G., Shupp, J. W., Kuprys, P. V., Choudhry, M. A., & Kovacs, E. J. (2019). Inhalation Injury: Unmet Clinical Needs and Future Research. *Journal of Burn Care and Research*, 40(5), 570–584. <https://doi.org/10.1093/jbcr/irz055>
- Enkhbaatar, P., Pruitt, B. A., Suman, O., Mlcak, R., Wolf, S. E., Sakurai, H., & Herndon, D. N. (2016). Pathophysiology, research challenges, and clinical management of smoke inhalation injury. *The Lancet*, 388(10052), 1437–1446.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31458-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31458-1)
- Foncerrada, G., Culnan, D. M., Capek, K. D., González-Trejo, S., Cambiaso-Daniel, J., Woodson, L. C., Herndon, D. N., Finnerty, C. C., Lee, J. O., & Plast Surg, A. (2018). Inhalation Injury in the Burned Patient HHS Public Access Author manuscript. *Ann Plast Surg*, 80(3), 98–105.
<https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000001377>.Inhalation
- Gülhan, B., Kanlk Yüksek, S., Hayran, M., Özkaya Parlakay, A., Güney, D., Akln Kağlzmanll, G., Kaygıslz, H., Tezer, H., & Senel, E. (2020). Infections in Pediatric Burn Patients: An Analysis of One Hundred Eighty-One Patients. *Surgical Infections*, 21(4), 356–361. <https://doi.org/10.1089/sur.2019.010>
- Hahn, A., Warnken, S., Pérez-Losada, M., Freishtat, R. J., & Crandall, K. A. (2018). Microbial diversity within the airway microbiome in chronic pediatric lung diseases. *Infection, Genetics and Evolution*, 63(June 2017), 316–325.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.006>
- Jin, J., Gan, Y., Liu, H., Wang, Z., Yuan, J., Deng, T., Zhou, Y., Zhu, Y., Zhu, H., Yang, S., Shen, W., Xie, D., Wu, H., Liu, D., & Li, W. (2019). Diminishing microbiome richness and distinction in the lower respiratory tract of lung cancer patients: A multiple comparative study design with independent validation. *Lung Cancer*, 136(January), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.08.022>
- Khanna, R., Singhal, K., Mohanty, S., Singhal, K., & Technology, I. (2016). Quantification of Single Drosophila Fly Genomic Dna Using Uv Spectrophotometry , Nanodrop and Qubit. *Zoological Society of Odisha*, XXVIII.
- Lachiewicz, A. M., Hauck, C. G., Weber, D. J., Cairns, B. A., & Van Duin, D. (2017). Bacterial Infections after Burn Injuries: Impact of Multidrug Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 65(12), 2130–2136. <https://doi.org/10.1093/cid/cix682>
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 1–103. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
- Liodaki, E., Kalousis, K., Schopp, B. E., Mailänder, P., & Stang, F. (2014). Prophylactic antibiotic therapy after inhalation injury. *Burns*, 40(8), 1476–1480.
<https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.01.022>
- Lipovy, B., Rihová, H., Gregorova, N., Hanslianova, M., Zaloudikova, Z., Kaloudova, Y., & Brychta, P. (2011). Epidemiology of ventilator-associated tracheobronchitis and

- ventilator-associated pneumonia in patients with inhalation injury at the burn centre in Brno (Czech Republic). *Annals of Burns and Fire Disasters*, 24(3), 120–125.
- Mahmoudi, H., Pourhajbagher, M., Chiniforush, N., Soltanian, A. R., Alikhani, M. Y., & Bahador, A. (2019). Biofilm formation and antibiotic resistance in meticillin-resistant and meticillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolated from burns. *Journal of Wound Care*, 28(2), 66–73. <https://doi.org/10.12968/jowc.2019.28.2.66>
- Moffatt, L. T., Madrzykowski, D., Gibson, A. L. F., Powell, H. M., Cancio, L. C., Wade, C. E., Choudhry, M. A., Kovacs, E. J., Finnerty, C. C., Majetschak, M., & Shupp, J. W. (2020). Standards in Biologic Lesions: Cutaneous Thermal Injury and Inhalation Injury Working Group 2018 Meeting Proceedings. *Journal of Burn Care and Research*, 41(3), 604–611. <https://doi.org/10.1093/JBCR/IRZ207>
- Murakami K., & Traber D. (2003). Pathophysiological basis of smoke inhalation injury. *News in Physiological Sciences*, 18(3), 125–129. <https://doi.org/10.1152/nips.01427.2002>
- Muthukumar, V., Arumugam, P. K., & Bamal, R. (2020). Role of systemic antibiotic prophylaxis in acute burns: A retrospective analysis from a tertiary care center. *Burns*, 46(5), 1060–1065. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.12.004>
- Nguyen, L. D. N., Viscogliosi, E., & Delhaes, L. (2015). The lung mycobiome: An emerging field of the human respiratory microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 6(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00089>
- O'Neill, M., McPartlin, J., Arthure, K., Riedel, S., & McMillan, N. D. (2011). Comparison of the TLDA with the nanodrop and the reference qubit system. *Journal of Physics: Conference Series*, 307(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/307/1/012047>
- QIAGEN. (2016). QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. *Qiagen*, 5, 1–72. <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>
- Reardon, C. M., La, T. P., Stephenson, A. J., & Freedlander, E. (1998). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in burns patients - Why all the fuss? *Burns*, 24(5), 393–397. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(98\)00036-9](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(98)00036-9)
- Rogers, A. D., Deal, C., Argent, A. C., Hudson, D. A., & Rode, H. (2014). Ventilator associated pneumonia in major paediatric burns. *Burns*, 40(6), 1141–1148. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2013.12.021>
- Spalding, M. C., & Minshall, C. T. (2020). Ventilator - Associated Pneumonia: New Definitions. *Brain, Behavior, and Immunity, January*, 277–292.
- Tanizaki, S., & Suzuki, K. (2012). No influence of burn size on ventilator-associated pneumonia in burn patients with inhalation injury. *Burns*, 38(8), 1109–1113. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.08.008>
- Tipton, L., Ghedin, E., & Morris, A. (2017). The lung mycobiome in the next-generation sequencing era. *Virulence*, 8(3), 334–341. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1235671>
- Twigg, H. L., Weinstock, G. M., & Knox, K. S. (2017). Lung microbiome in human immunodeficiency virus infection. *Translational Research*, 179, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.07.008>

- van Duin, D., Strassle, P. D., DiBiase, L. M., Lachiewicz, A. M., Rutala, W. A., Eitas, T., Maile, R., Kanamori, H., Weber, D. J., Cairns, B. A., Napravnik, S., & Jones, S. W. (2016). Timeline of health care-associated infections and pathogens after burn injuries. *American Journal of Infection Control*, *44*(12), 1511–1516. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.07.027>
- Walker, P. F., Buehner, M. F., Wood, L. A., Boyer, N. L., Driscoll, I. R., Lundy, J. B., Cancio, L. C., & Chung, K. K. (2015). Diagnosis and management of inhalation injury: An updated review. *Critical Care*, *19*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-1077-4>
- Walters, W., Hyde, E. R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., Gilbert, J. A., Jansson, J. K., Caporaso, J. G., Fuhrman, J. A., Apprill, A., & Knight, R. (2016). Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *MSystems*, *1*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1128/msystems.00009-15>
- Wanis, M., Walker, S. A. N., Daneman, N., Elligsen, M., Palmay, L., Simor, A., & Cartotto, R. (2016). Impact of hospital length of stay on the distribution of Gram negative bacteria and likelihood of isolating a resistant organism in a Canadian burn center. *Burns*, *42*(1), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2015.07.010>
- Wei-hua et. al., 2012. (2012). *Case report Fungal infection after a tragedy : a report of three cases of*. *125*(30970130), 2628–2631. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.14.040>
- Xiao, P., Sun, S., Cao, J., Wang, J., Li, H., Hou, S., Ding, H., Liu, Z., Fang, Y., Bai, S., Qin, X., Yu, F., Liu, J., Wang, X., Lv, Q., & Fan, H. (2018). Expression profile of microRNAs in bronchoalveolar lavage fluid of rats as predictors for smoke inhalation injury. *Burns*, *44*(8), 2042–2050. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2018.07.009>
- Yamamura, H., Morioka, T., Hagawa, N., Yamamoto, T., & Mizobata, Y. (2015). Computed tomographic assessment of airflow obstruction in smoke inhalation injury: Relationship with the development of pneumonia and injury severity. *Burns*, *41*(7), 1428–1434. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2015.06.008>
- Yatera, K., Noguchi, S., & Mukae, H. (2018). The microbiome in the lower respiratory tract. *Respiratory Investigation*, *56*(6), 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2018.08.003>
- Zakharkina, T., Martin-Loeches, I., Matamoros, S., Povoas, P., Torres, A., Kastelij, J. B., Hofstra, J. J., De Wever, B., De Jong, M., Schultz, M. J., Sterk, P. J., Artigas, A., & Bos, L. D. J. (2017). The dynamics of the pulmonary microbiome during mechanical ventilation in the intensive care unit and the association with occurrence of pneumonia. *Thorax*, *72*(9), 803–810. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209158>
- Zhou, J., Tan, J., Gong, Y., Li, N., & Luo, G. (2019). Candidemia in major burn patients and its possible risk factors: A 6-year period retrospective study at a burn ICU. *Burns*, *45*(5), 1164–1171. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.01.005>
- Ziegler, B., Hundeshagen, G., Uhlmann, L., Will Marks, P., Horter, J., Kneser, U., & Hirche, C. (2019). Impact of diagnostic bronchoscopy in burned adults with suspected

POUŽITÉ ZDROJE

inhalation injury. *Burns*, 45(6), 1275–1282.
<https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.07.011>