

MASARYKOVA UNIVERZITA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

# Diplomová práce

BRNO 2012

Kateřina Olejníčková



MASARYKOVA UNIVERZITA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

---



Klinické izoláty *Pseudomonas aeruginosa* – porovnání  
vybraných faktorů virulence

Diplomová práce

Kateřina Olejníčková

Vedoucí práce: Ing. Veronika Holá, Ph.D.

Brno 2012

# BIBLIOGRAFICKÝ ZÁZNAM

- Autor:** Bc. Kateřina Olejníčková  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav experimentální biologie
- Název práce:** Klinické izoláty *Pseudomonas aeruginosa* – porovnání vybraných faktorů virulence
- Studijní program:** Biologie
- Studijní obor:** Obecná biologie, směr Mikrobiologie
- Vedoucí práce:** Ing. Veronika Holá, Ph.D.
- Akademický rok:** 2012
- Počet stran:** 84+5
- Klíčová slova:** *Pseudomonas aeruginosa*, katérové infekce, biofilm, faktory virulence

## BIBLIOGRAPHIC ENTRY

**Author:** Bc. Kateřina Olejníčková  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of experimental biology

**Title of thesis:** Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* - comparison of selected virulence factors

**Degree programme:** Biology

**Field of study:** General biology, specialization Microbiology

**Supervisor:** Ing. Veronika Holá, Ph.D.

**Academic Year:** 2012

**Number of Pages:** 84+5

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, catheter-related infections, biofilm, virulence factors

## ABSTRAKT

Zkvalitňování lékařské péče s sebou nese vyšší počet invazivních zákroků a vyšší počet operacemi oslabených pacientů náchylných k nozokomiálním infekcím. *Pseudomonas aeruginosa* je jedním z nejčastěji izolovaných nozokomiálních druhů. Léčba pseudomonádových infekcí je díky antibiotické rezistenci problematická a infekce jsou často recidivující. S procesem patogeneze pseudomonádových infekcí je spojena řada faktorů virulence.

V rámci překládané studie bylo vyšetřeno 175 katéetrových izolátů *Pseudomonas aeruginosa* na tvorbu biofilmu, pohyblivost, sekreci vybraných extracelulárních látek a antibiotickou rezistenci. Dále byla sledována účinnost antibiotické zátky proti vybraným biofilm-pozitivním kmenům. Vysoké procento kmenů byla schopno produkovat hemolyziny, LasB elastázu, pyoverdiny a tvořit aerovaný i submerzní biofilm ( $> 80\%$ ). Mezi tvorbou submerzního a aerovaného biofilmu byla prokázána pozitivní korelace ( $p \ll 0,0001$ ;  $\gamma = 0,5694$ ). Většina kmenů ( $> 90\%$ ) byla pohyblivá pomocí *swarming* a *swimming* motility, tři čtvrtiny izolátů byly pohyblivé pomocí *twitching* motility. Ze sledovaných faktorů virulence byla mezi kmeny nízká pouze sekrece pyocyaninu a pyochelinu ( $< 26\%$ ). Nejvíce účinnými antibiotiky byly kolistin a amikacin.

Pozitivní korelace byla prokázána u produkce některých extracelulárních látek (mezi produkcí pyochelinu a pyocyaninu, pyocyaninu a LasB elastázy, pyoverdinů a hemolyzinů) a mezi produkcí submerzního a aerovaného biofilmu. Sekrece hemolyzinů korelovala pozitivně se *twitching* motilitou a negativně s *swimming* motilitou. Tvorba pigmentů korelovala negativně s produkcí submerzního biofilmu a pozitivně s produkcí aerovaného biofilmu. Všechny korelace jsou významné na hladině  $p = 0,05$  a vykazují korelaci  $\gamma \geq 0,40$ .

Z antibiotických zátek byly nejvíce účinné zátky s 70% etanolem, 30% etanolem se 4% citrátů sodného, 1 mg/ml ciprofloxacinu.

## ABSTRACT

Health care quality improvement brings about an increasing number of invasive diagnostic and therapeutic procedures and thus also high-risk patients prone to hospital-acquired infections. *Pseudomonas aeruginosa* is commonly isolated nosocomial pathogen. The treatment of the infection is often problematic, with frequent recurrences. The pathogenesis of *Pseudomonas* infection is associated with a range virulence factors.

In the present study 175 catheter-related isolates were screen for the biofilm formation, motility, secretion of selected extracellular products and antibiotic resistance. The effectiveness of the antibiotic lock technique against selected biofilm-positive strains was evaluated. A high rate of the strains were producers of hemolysins, LasB elastase, pyoverdins and they were able to form submersial and air-liquid interface biofilm (> 80 %). A positive correlation was found between the two types of biofilm formation ( $p \ll 0,0001$ ;  $\gamma = 0,5694$ ). A high rate of the strains (> 90 %) showed swarming and swimming motility, three-fourths of strains performed twitching motility. Among the virulence factors studied, only pyocyanin and pyochelin were produced by a lower proportion of isolates (< 26 %). The most effective antibiotics were colistin and amikacin.

A positive correlation was seen between the production of some extracellular molecules (pyochelin and pyocyanin, pyocyanin and LasB elastase, pyoverdins and hemolysins) and between submersial and air-liquid interface biofilm formation. The hemolysins production correlated positively with twitching motility and negatively with swimming motility. Surprisingly a positive correlation was found between pigments production and submersial biofilm but on the other hand between pigments production and air-liquid interface biofilm was a negative correlation. All correlations were significant at the level  $p = 0,05$  with correlation coefficient  $\gamma \geq 0,40$ .

Biofilm was completely eradicated in all strains by 70% ethanol, 30% ethanol with 4% trisodium citrate, 1 mg/ml ciprofloxacin.



**Vysoká škola:** Masarykova univerzita

**Fakulta:** přírodovědecká

**Pracoviště:** Ústav experimentální biologie

**Akademický rok:** 2009/2010



# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

**Magisterský studijní program:** Biologie

**Studijní obor:** Obecná biologie, zaměření Mikrobiologie

**Student(ka):** Bc. Kateřina Olejníčková

Vedoucí diplomové práce Vám ve smyslu zákona vlády ČR č. 111/1998 Sb., čl. o státních závěrečných zkouškách a státních rigorózních zkouškách, určuje tuto diplomovou práci:

**Název tématu:** **Klinické izoláty *Pseudomonas aeruginosa* – porovnání vybraných faktorů virulence**

**Název tématu anglicky:** **Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* - comparison of selected virulence factors**

**Vedoucí diplomové práce:** Ing. Veronika Holá, Ph.D.

## Zásady pro vypracování

### **Anotace:**

Se vzrůstající kvalitou lékařské péče se do popředí zájmu mikrobiologických pracovišť dostávají nozokomiální infekce a oportunní patogeny. Onemocnění vyvolaná těmito patogeny jsou často obtížně léčitelná, chronická a recidivující.

Jedním z nejčastěji izolovaných oportunně patogenních druhů je *Pseudomonas aeruginosa*. Jednotlivé kmeny *P. aeruginosa* mohou být vybaveny různými faktory virulence, které usnadňují kolonizaci i rozvoj infekce, přičemž produkce těchto faktorů se mezi kmeny výrazně liší.

Diplomová práce se zaměří na stanovení vybraných faktorů virulence, zjištění vztahu mezi nimi a zhodnocení účinnosti antimikrobiální terapie proti biofilm-tvořícím kmenům *P. aeruginosa*. Citlivost izolovaných kmenů k antibiotikům bude testována stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální biofilm eradikující koncentrace (MBEC).

## Časový harmonogram řešení (postup):

2010 - Sběr klinických izolátů, jejich druhová identifikace a vyšetřování faktorů virulence u izolovaných kmenů. Zpracování literární rešerše.

2011 - Pokračování sběru klinických izolátů, druhové identifikace a vyšetřování faktorů virulence.

Jaro 2012 - Sepsání a odevzdání DP.

**Rozsah diplomové práce:** 50 stran

**Rozsah grafických příloh:** dle pokynů vedoucí dp

### Doporučená literatura:

1. Bestul M. B., van den Bussche H. L., 2005: Antibiotic Lock Technique: Review of the Literature; Pharmacotherapy; 25; p. 211–227.
2. Costerton, J. W., 1999: Introduction to biofilm; Int.J.Antimicrob.Agents; 11; p. 217–221.
3. Darouiche R. O., 2001: Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. Clin. Infec.Dis.; 33; p. 1567–1572.
4. Mah, T. F., O'Toole, G. A., 2001: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents; Trends Microbiol.; 9; p. 34–39.
5. Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A., 2002 [4th edition]: Medical microbiology, Mosby, St. Louis, 2488 p.
6. Paleroni N.J.,1984: Pseudomonas, 1591–1606. In: Krieg, Noel, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
7. Stickler D. J., Morris N. S., Williams T. J., 1996: An assessment of the ability of a silver-releasing device to prevent bacterial contamination of urethral catheter drainage systems; Br. J. Urol.; 78; p. 579–588.

**Datum zadání diplomové práce:** 28.11.2010


### Termín odevzdání diplomové práce:

Termín odevzdání diplomové práce dle harmonogramu příslušného akademického roku.

V Brně dne 28.11.2010.

-----  
Bc. Kateřina Olejníčková  
podpis studenta

HS'  
-----  
Ing. Veronika Holá, Ph.D.  
podpis vedoucího diplomové práce

-----  
  
ředitel ústavu



# PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce ing. Veronice Holé, Ph.D. za odborné vedení, nakažlivý entuziasmus a cenné rady nejen při sepisování diplomové práce. Dále děkuji ing. Jaroslavu Hrabákovi, Ph.D. za provedení konfirmačního testu při detekci metalo- $\beta$ -laktamáz. Ing. Petru Snopkovi děkuji za pomoc s grafickou úpravou textu. Za neocenitelnou pomoc při práci v laboratoři bych ráda poděkovala pracovníkům Mikrobiologickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice u svaté Anny v Brně, především p. Krškové a pracovníkům technického úseku.

Diplomová práce byla vypracována na Mikrobiologickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice u svaté Anny v Brně. Práce byla podpořena z grantových projektů IGA MZ ČR 9678, MŠMT 1M0528 a MŠMT INGO LA 10037.

# PROHLÁŠENÍ

Čestně prohlašuji, že jsem diplomovou práci *Klinické izoláty Pseudomonas aeruginosa – porovnání vybraných faktorů virulence* vypracovala samostatně a použila jsem pouze zdroje uvedené v seznamu literatury.

V Brně 10. 5. 2012

---

Kateřina Olejníčková

---

**OBSAH**

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>15</b>
1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .	15
1.2	Klinický význam <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .	16
1.2.1	Infekce dýchacích cest pacientů s cystickou fibrózou . . . . .	18
1.2.2	Infekce popálenin . . . . .	18
1.2.3	Katéetrové infekce . . . . .	19
1.3	Patogeneze pseudomonádových infekcí . . . . .	20
1.3.1	<i>Quorum-sensing</i> systém . . . . .	21
1.3.2	Sekreční systémy . . . . .	22
1.4	Faktory virulence <i>P. aeruginosa</i> . . . . .	23
1.4.1	Adheziny . . . . .	24
1.4.2	Pohyblivost . . . . .	24
1.4.3	Proteázy . . . . .	26
1.4.4	Exotoxin A . . . . .	27
1.4.5	Exoenzym S, exoenzym T a exotoxin U . . . . .	28
1.4.6	Hemolyziny . . . . .	29
1.4.7	Siderofory . . . . .	29
1.4.8	Pyocyanin . . . . .	30
1.4.9	Lipopolysacharid . . . . .	31
1.4.10	Alginát . . . . .	31
1.4.11	Biofilm . . . . .	31
1.4.12	Rezistence k antibiotikům . . . . .	33
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>38</b>
3.1	Materiál . . . . .	38
3.1.1	Použité mikroorganizmy . . . . .	38

---

3.1.2	Kultivační média . . . . .	38
3.1.3	Chemikálie a roztoky . . . . .	40
3.1.4	Komerční identifikační soupravy . . . . .	42
3.1.5	Pomůcky . . . . .	42
3.1.6	Přístroje . . . . .	43
3.1.7	Software . . . . .	43
3.2	Metody . . . . .	43
3.2.1	Uchovávání kmenů . . . . .	44
3.2.2	Průkaz pohyblivosti kmene . . . . .	45
3.2.3	Průkaz tvorby biofilmu . . . . .	45
3.2.4	Produkce extracelulárních látek . . . . .	47
3.2.5	Testování citlivosti k antibiotikům . . . . .	49
3.2.6	Testování účinnosti antibiotických zátek . . . . .	51
3.2.7	Statistické vyhodnocení . . . . .	53
<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>54</b>
4.1	Charakteristika souboru . . . . .	54
4.2	Průkaz tvorby biofilmu . . . . .	55
4.3	Průkaz pohyblivosti kmenů . . . . .	57
4.4	Sekretované látky . . . . .	58
4.4.1	Hemolyziny . . . . .	58
4.4.2	LasB elastáza . . . . .	59
4.4.3	Tvorba pigmentů . . . . .	59
4.5	Citlivost k antibiotikům . . . . .	60
4.5.1	Detekce $\beta$ -laktamáz . . . . .	60
4.6	Korelace mezi faktory virulence . . . . .	61
4.6.1	Korelace mezi tvorbou biofilmu a ostatními faktory virulence . . . . .	62
4.7	Antibiotické zátky . . . . .	62
4.7.1	Stanovení hodnot MIC, MBC . . . . .	62
4.7.2	Antibiotické zátky . . . . .	62

---

<b>5</b>	<b>Diskuze</b>	<b>65</b>
5.1	Tvorba biofilmu . . . . .	65
5.2	Pohyblivost . . . . .	66
5.3	Tvorba extracelulárních látek . . . . .	67
5.3.1	Tvorba hemolyzinů . . . . .	67
5.3.2	Tvorba LasB elastázy . . . . .	68
5.3.3	Tvorba pigmentů . . . . .	68
5.4	Citlivost k antibiotikům . . . . .	69
5.5	Korelace mezi faktory virulence . . . . .	70
5.6	Antibiotické zátky . . . . .	71
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>73</b>
<b>A</b>	<b>Přílohy</b>	<b>85</b>
A.1	Původ kmenů . . . . .	85

## Seznam nejčastějších zkratk

ATB	antibiotikum
ATB zátka	antibiotická zátka
CF	cystická fibróza
CFU	kolonie tvořící jednotka ( <i>colony-forming units</i> )
ESBL	širokospektré $\beta$ -laktamázy
ETA	exotoxin A
MBL	metalo- $\beta$ -laktamázy
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MDR	multirezistentní
OD	optická denzita
QS systém	<i>quorum-sensing</i> systém
SCVs	malé kolonie ( <i>small-colony variants</i> )
CK	cévní katétr
MK	močový katétr
M	muž
Ž	žena
A	ambulance
L	lůžková část
JIP	jednotka intenzivní péče

### Média a chemikálie

BHIg	mozkosrdcová infúze ( <i>brain heart infusion</i> ) se 4 % glukózy
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
LB	Luria-Bertani médium
MH	Mueller-Hinton médium
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
TSC	citrát sodný

### Antibiotika

AK	amikacin
AMC	amoxicilin/kyselina klavulanuvá
ATM	aztreonam

---

CAZ	ceftazidim
CFP	cefoperazon
CIP	ciprofloxacín
CN	gentamicin
CT	kolistin
CTX	cefotaxim
FEP	cefepim
FOX	cefoxitin
IMP	imipenem
MEM	meropenem
OFXN	ofloxacin
SCF	cefoperazon/sulbaktam
TZP	piperacilin/tazobaktam

### **Klinická zařízení a jednotlivá oddělení**

FNUSA	Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně
CKTCH	Centrum transplantační a kardiovaskulární chirurgie
MOÚ	Masarykův onkologický ústav
NMB	Nemocnice Milosrdných bratří
I. CHK	I. Chirurgická klinika
I. IKK	I. Interní kardiologická klinika
I. NK	I. Neurologická klinika
II. CHK	II. Chirurgická klinika
II. IK	II. Interní klinika
ARK	Anesteziologicko-resuscitační klinika
G	Gynekologie
I	Interní oddělení
KCH	Kardiochirurgie
KKOP	Klinika komplikované onkologické péče
NCHK	Neurochirurgická klinika
ORL	Otorhinolaryngologie
U	Urologické oddělení

# 1 ÚVOD

## 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

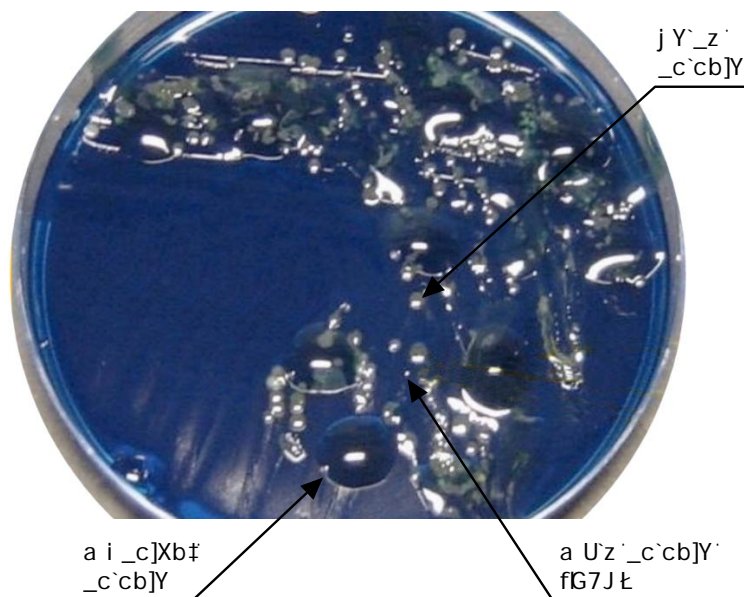
*Pseudomonas aeruginosa* patří do rodu *Pseudomonas*, který je typovým rodem čeledi *Pseudomonadaceae*, jež náleží do řádu *Pseudomonadales*, třídy *Gammaproteobacteria*, kmene *Proteobacteria* a domény *Bacteria* (Sedláček 2007).

*Pseudomonas aeruginosa* je gramnegativní bakterie tyčinkovitého tvaru o velikosti 1,5–5,0  $\mu\text{m}$  na 0,5–1,0  $\mu\text{m}$  (Gowan 1999). *P. aeruginosa* je velmi nenáročným druhem. Vyskytuje se ve vodě, v půdě nebo na povrchu rostlin. Přežívá i v mýdlových usazeních, destilované vodě a zředěných roztocích dezinfekčních prostředků (Ondrovčík 2003). Je tolerantní k vyšším koncentracím solí, snese pH nižší než 4,5, přirozená rezistence ji chrání před některými antibiotiky a antiseptiky (Stanier a kol. 1966). Běžně slouží k záchytu pseudomonád z klinického materiálu krevní agar, Endův agar nebo MacConkey agar (Ondrovčík 2003). Na krevním agaru tvoří mnohé kmeny zónu úplné hemolýzy (Murray a kol. 2002). K selektivnímu záchytu mikroba slouží pseudomonádový agar typu P a cetrimidový agar (Votava 1999). Optimální teplota růstu je 35 °C, roste však v rozmezí teplot 4–42 °C (Ondrovčík 2003). Metabolismus pseudomonád je chemoorganotrofní, terminálním akceptorem elektronů je zpravidla kyslík (Palleroni 2005).

Genom *P. aeruginosa* (kmen PAO1) obsahuje 6,3 Mbp a 5 770 otevřených čtecích rámců, čímž se řadí k největším známým genomům bakterií (Stover a kol. 2000). Pseudomonády vykazují velkou fenotypovou plasticitu danou inducibilními operony, což jim umožňuje osidlovat četné ekologické niky, kolonizovat prostředí lidského těla, odolávat jeho imunitnímu systému a perzistovat v podobě chronických infekcí (Gowan 1999, Murray a kol. 2002).

*P. aeruginosa* vytváří na pevném agaru několik morfotypů (Ciofu a kol. 2008, Palleroni 2005). Velké hladké kolonie s vyvýšeným středem mají průměr okolo 3–4 mm (kultivace 48 hod při 37 °C) (Haüßler a kol. 2003). Mukoidní kmeny vykazují zvýšenou produkci exopolysacharidů, jež chrání bakterie v prostředí makroorganismu. Mukoidní vzhled je typický pro izoláty z plic (Palleroni 2005). Malé drsné kolonie s konvexním profilem (v anglické literatuře *small colony variants* – SCVs) jsou hydrofobnější, autoagregativní a velmi adherentní (Steinmetz 2003). Jejich velikost se udává kolem 1 mm v průměru (kultivace 48 hodin při 37 °C) (Haüßler a kol. 2003). SCVs lépe odolávají podmínkám vnějšího prostředí, např. oxidativnímu stresu. Malé kolonie jsou četnější při kultivaci buněk izolovaných z biofilmu (Starkey a kol. 2009). Pozornost vědců zabývajících se studiem SCVs se zaměřuje na příčiny konverze stejně jako na mechanismy vedoucí k vyšší odolnosti kolonií.

Morfologická rozmanitost kolonií *Pseudomonas aeruginosa* je patrná na obrázku 1.



**Obrázek 1:** Velký, malý a mukoidní typ kolonie *P. aeruginosa*, převzato z Ciofu a kol. (2008), upraveno.

U pseudomonád je typický ovocný nebo květinový zápach kolonií. Vůně je dána přítomností redukovaného trimetylaminu (Mára 1972). Velmi charakteristická je také produkce solubilních barviv – zelenomodrého pyocyaninu, žlutozelených fluoreskujících pyoverdinů (fluoresceinů), řidčeji pak hnědavého pyochelinu a červenohnědého pyorubinu. Množství sekretovaných enzymů (proteáz, lecitinázy, želatinázy) a toxinů (exotoxin A, exoenzym S) se podílí na rozvoji oportunních infekcí (Palleroni 2005).

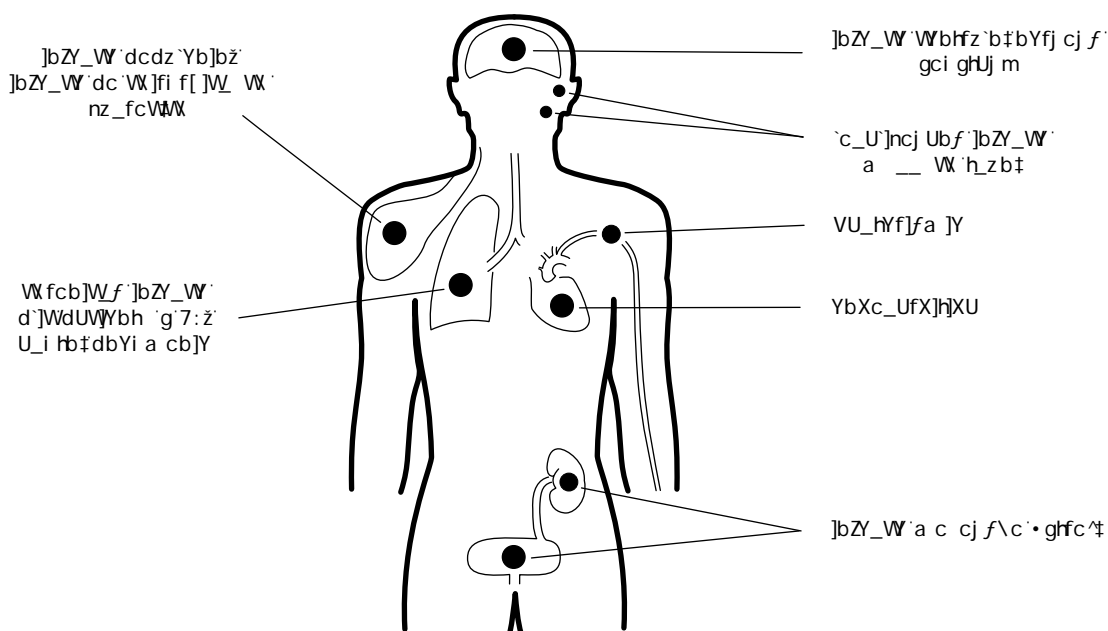
## 1.2 Klinický význam *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* je oportunní patogen mnoha živočišných druhů včetně člověka (Palleroni 2005). Pro většinu osob je mikrob neškodným kolonizátorem, přesto může vyvolat onemocnění s fatálními následky. Komunitní infekce zahrnují především infekce očí u osob, které používají kontaktní čočky, a infekce středního ucha u dětí (Iglewski 1996). Pseudomonádové infekce jsou závažným problémem zejména v nemocničním prostředí, pro imunokompromitované (leukopenie, AIDS, imunosuprese léčivy) a oslabené pacienty, pro osoby se zavedeným katétrem. V těžkých případech končí infekce bakteriemií, sepsí a



smrtí (Gowan 1999). Mortalita je dána kombinací oslabení hostitelského organismu, rezistencí bakterií k antibiotické léčbě a produkcí extracelulárních enzymů a toxinů (Iglewski 1996).

*P. aeruginosa* bývá izolována z chronických infekcí plic pacientů s cystickou fibrózou, jež se díky antibiotické rezistenci kmenů obtížně léčí a obvykle končí smrtí (Vávrová 2006). Bakterie se často vyskytuje na jednotkách intenzivní péče, kde způsobuje pneumonie a infekce močových cest. Infekce jsou velmi často spojené s přítomností lékařského vybavení jako jsou katétrů nebo respirátorů (Bodey a kol. 1983). Nejčastější pseudomonádové infekce jsou zobrazeny na obrázku 2.



**Obrázek 2:** Nejčastější typy infekcí způsobených *P. aeruginosa*, převzato z Iglewski (1996), upraveno.

Mikrob se v nemocničním prostředí snadno šíří, kontaminuje jídlo, lékařské vybavení (dialyzační přístroje, respirátory apod.) a dokonce zředěné roztoky dezinfekčních prostředků (Murray a kol. 2002). Desátý den hospitalizace je nositelem bakterie každý druhý pacient. Onemocnění se může rozvinout i z endogenního ložiska. Pseudomonády jsou součástí běžné flóry orofarynxu u 6% populace a ve feces se vyskytují u pětiny populace (van Delden a Iglewski 1998).

Kromě *P. aeruginosa* mají klinický význam i druhy *P. fluorescens*, *P. mendocina*, *P. putida* nebo *P. stutzeri* (Ondrovčík 2003).

### 1.2.1 Infekce dýchacích cest pacientů s cystickou fibrózou

Cystická fibróza (CF) je dědičné autozomálně recesivní onemocnění. Defekt genu kódující protein CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) na 7. chromozomu způsobuje produkci nefunkčního chloridového kanálu. Dochází k disbalanci mezi sodnými a chloridovými ionty, jež se projevuje nadměrnou produkcí hustého sekretu v především v dýchacím a gastrointerstiniálním traktu. Nahromaděný hlen v dýchacím ústrojí je vhodným prostředím pro rozvoj bakteriální infekce, v trávicím traktu dochází ke zjizvení a produkci cyst, ucpávání vývodů slinivky břišní narušuje trávicí procesy (Vávrová 2006). Příčinou smrti jsou obvykle recidivující chronické infekce dýchacího ústrojí doprovázené zánětlivými procesy, které vyústí v degeneraci plicní tkáně (Parsek a Yahr 1991, Vávrová 2006). V České republice je každý 26. člověk přenašečem defektního genu *CFTR*.

Nejdůležitějším patogenem plic pacientů s CF je *P. aeruginosa*. Přítomnost bakterie byla v rámci studií uskutečněných v České republice prokázána u 82 % zemřelých a u 50 % žijících pacientů. Většina pacientů je pravděpodobně infikována již v raném věku (Vávrová a kol. 2008). Častý výskyt *P. aeruginosa* u pacientů s CF souvisí se změněným prostředím dýchacího traktu (snížením mukociliárního odstraňování cizích těles, menší aktivitou neutrofilů, přítomností specifických receptorů GM<sub>1</sub>) stejně jako s vlastnostmi bakterie, především s přítomností mukoidních forem kolonií a tvorbou biofilmu (Vávrová 2006). Bakterie v podobě biofilmu mohou perzistovat uvnitř hustého hlenu v dýchacích cestách po velmi dlouhou dobu i přes antibiotickou terapii (Breidenstein a kol. 2011). Pro kmeny způsobující chronické infekce pacientů s CF je charakteristický pokles produkce extracelulárních faktorů virulence, ztráta O antigenu a vyšší výskyt SCVs. Přes masivní bakteriální kolonizaci sputa jsou infekce neinvazivní a netoxické. Většina pacientů má vysoké titry protilátek, ale organismus není schopen ložisko infekce zničit (Iglewski 1996).

### 1.2.2 Infekce popálenin

Popálená nekrotická tkáň je velmi náchylná k infekci. Ovlivnění funkce imunitního systému při rozsáhlejšímu poškození a dostatek živin z nekrotické tkáně tvoří vhodné prostředí pro mikrobiální kolonizaci a rozvoj infekce (Lipový a kol. 2010). Zpočátku je popálená tkáň osídlena gram pozitivními bakteriemi, po týdně jsou do procesu kolonizace zapojeny i gram negativní tyčinky (Šrámová a kol. 1995). *P. aeruginosa* tvoří desetinu izolátů, přičemž v průběhu hospitalizace dochází k nárůstu počtu zachycených kmenů (Lipový

a kol. 2010). Penetrace bakterií do krevního řečiště a následná sepse je spojena s úmrtností kolem 60 % (Ondrovčík 2003). Používání lékařského vybavení (respirátory, katétrů) u těžce popálených osob dále zvyšuje náchylnost pacientů k rozvoji bakteriální infekce (David 2005). Umělé povrchy jsou vhodným místem pro adhezi mikroorganismů a rozvoj biofilmu.

### 1.2.3 Katérové infekce

Moderní lékařská péče je spojená s častým používáním močových i cévních katétrů (Trautner a Darouiche 2004). Katétrů (cévní i močové) patří k nejčastěji zaváděným lékařským vybavením a kolonizace katétru představuje jeden z nejběžnějších zdrojů nozokomiálních infekcí krevního řečiště. Přítomnost katétrů ve vnitřním prostředí pacienta traumatizuje okolní tkáň, obchází obranné mechanismy hostitele a vytváří vhodné podmínky pro bakteriální kolonizaci (David 2005). Vznik infekce je ovlivněn charakterem katétru (hydrofobicitou, elektrostatickými silami), reakcí pacienta na zavedení katétru (pokrytí povrchu cévního katétru plazmatickými proteiny) i vlastnostmi mikroorganismu (přítomnost adhezínů a dalších faktorů virulence). Velmi důležitá je pro rozvoj infekce i schopnost mikroba tvořit biofilm v lumen katétru (Trautner a Darouiche 2004). Biofilmové ložisko představuje perzistentní zdroj mikrobů, kteří se následně šíří do organismu. *P. aeruginosa* a další gramnegativní bakterie jsou etiologickým agens v 10–20 % katérových infekcí (Rodríguez-Baño 2002). Přítomnost *P. aeruginosa* ve vzorku pacienta s katérovou infekcí lze řešit konzervativně nasazením systémově podaného antibiotika, popř. odstraněním katétru (Rodríguez-Baño 2002) nebo s využitím techniky antibiotické zátky (Metcalf a kol. 2004, Opilla a kol. 2007).

#### Infekce cévních katétrů

Infekce cévních katétrů jsou spojeny s vysokou mortalitou (Kolář 2003). Ze studie, kterou provedli Trautnerem a Darouiche (2004), vyplývá, že přítomnost katétru je druhou nejčastější příčinou rozvoje nozokomiální infekce krevního řečiště s mortalitou až 25 %. Katétr se po zavedení pokrývá vrstvou plazmatických proteinů (především fibrinem a fibronectinem), které usnadňují kolonizaci. *Pseudomonas* spp. se podílí necelými 20 % na vzniku septikémie v souvislosti se zavedením centrálních žilních katétrů (Droste a kol. 2003). Díky rezistenci mnoha izolátů vůči antimikrobní terapii je mortalita pseudomonádových bakteriemií kolem 50 % (Iglewski 1996).

## Infekce močových katétrů

Infekce močového traktu spojené s přítomností katétru tvoří 40–50 % nozokomiálních infekcí, jsou tedy nejčastějšími nozokomiálními infekcemi vůbec (Mittal a kol. 2009, Savas a kol. 2006). Katétrizace patří mezi nejdůležitější rizikové faktory pro rozvoj nozokomiálních infekcí močového traktu (Savas a kol. 2006). Měsíc po zavedení katétru jsou postiženi urinární infekcí prakticky všichni pacienti (van Delden a Iglewski 1998). Kromě délky katétrizace se na vzniku infekce podílejí i primární onemocnění, popř. terapeutické zákroky provedené v oblasti močového ústrojí, celkový stav, věk a pohlaví pacienta (Šrámová a kol. 1995). Infekce představuje prodloužení léčby, zvýšení nákladů na léčbu a v neposlední řadě další infekce zatěžuje pacienta, což může být u osob v těžkém stavu fatální (mortalita infekcí močových katétrů je do 5 %) (Mittal a kol. 2009). Mikroby se mohou šířit z močového traktu dále do organismu, močové katétrů jsou příčinou více než 17 % nozokomiálních bakteriemií (Saint a Lipsky 1999). Častou komplikací kolonizace katétru jsou pyurie, pyelonefritida nebo chronický zánět ledvin. Při dlouhodobém zavedení jsou močové katétrů ohroženy inkrustací proteiny, elektrolyty a dalšími organickými sloučeninami z moči pacienta (Trautner a Darouiche 2004).

## 1.3 Patogeneze pseudomonádových infekcí

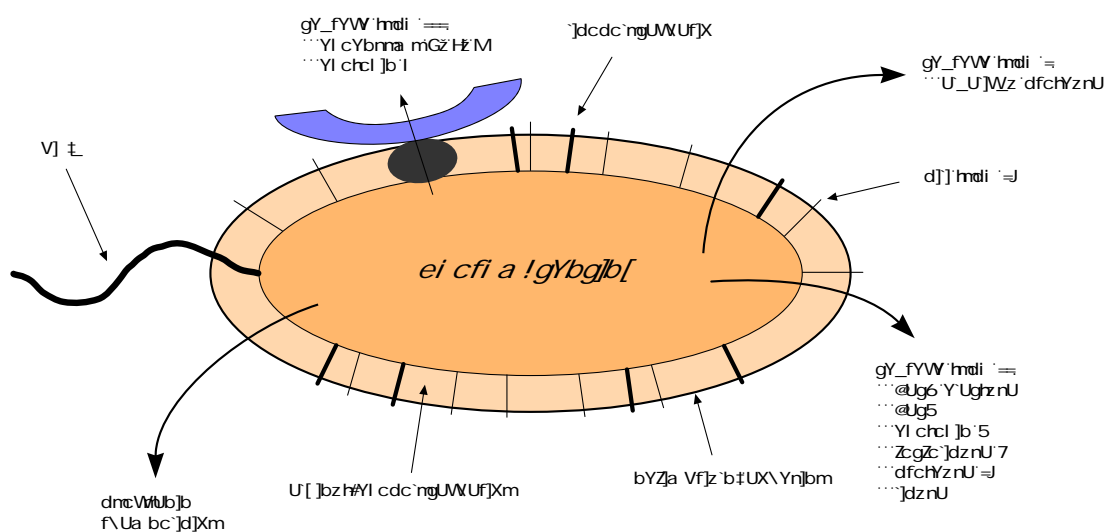
Patogenní mikroorganismus je schopen za určitých podmínek vyvolat onemocnění hostitele. Míra patogenity konkrétního bakteriálního kmene je dána jeho virulencí, tedy přítomností faktorů virulence, které umožňují mikrobu proniknout do makroorganismu a udržet se v něm (Votava 2005). Jako faktory virulence *P. aeruginosa* slouží struktury na povrchu buňky (lipopolysacharid, bičíky, pili), látky sekretované do prostředí a další faktory (např. schopnost tvořit biofilm).

Produkce jednotlivých faktorů virulence je závislá na podnětech z prostředí. Při akutním onemocnění a během prvních fází infekce je produkce toxinů vysoká, naopak chronické infekce se vyznačují nízkou hladinou extracelulárních faktorů virulence (van Delden a Iglewski 1998). Buňka reaguje na podmínky vnějšího prostředí (teplotu, osmolaritu, přítomnost železa a dusíkatých látek) (Bjarnsholt a Givskov 2007), významným stimulem po zahájení sekrece faktorů virulence je dosažení určité koncentrace buněk vlastního druhu v nejbližším okolí (Johnson a Boese-Marrazzo 1980, Rampioni a kol. 2009). Schopnost detekovat jiné buňky je umožněna systémem *quorum-sensing* (QS), který zajišťuje, že faktory virulence se začnou sekretovat až ve chvíli, kdy je přítomno dostatečné množství bakterií (Bjarnsholt a Givskov 2007).

### 1.3.1 Quorum-sensing systém

Pseudomonádový QS systém umožňuje pomocí signálních molekul komunikaci mezi jednotlivými buňkami. QS systému se uplatňuje ve stacionární fázi růstu (Palleroni 2005), kdy řídí expresi asi 350 genů, tj. 6 % genomu (Veesenmeyer a kol. 2009). Ovlivněny jsou geny podílející se na tvorbě biofilmu (syntéza alginátu, tvorba pilů typu IV) (Adonizio a kol. 2008) i produkce extracelulárních látek (proteáz, exotoxinu A, pyocyaninu). Celkově reguluje QS systém více než 30 faktorů virulence (Bjarnsholt a Givskov 2007). Vybrané faktory virulence a ústřední role QS systému při jejich produkci jsou znázorněny na obrázku 3.

QS systém *P. aeruginosa* zahrnuje systémy *las*, *rhl* a pseudomonádový chinolonový signál (*PQS*) (Pesci a kol. 1999). Systémy jsou hierarchicky uspořádány, *las* tvoří vrchol signální dráhy, řídí sekreci *PQS* a ten ovlivňuje *rhl*. Induktory jednotlivých systémů jsou specifické, nicméně metabolické kaskády jsou propojeny tak, že QS systém tvoří jeden celek (van Delden a Iglewski 1998).



**Obrázek 3:** QS systém a jednotlivé faktory virulence *P. aeruginosa* řízené tímto systémem, převzato z van Delden 2004, upraveno.

*Las* systém se skládá z genů *lasI* a *lasR*. Protein LasI má autoregulační funkci, podílí se na syntéze N-(3-oxododekanoyl)-homoserin laktonu (3-O-C12-HSL), LasR je aktivací protein. Gen *lasI* je aktivován komplexem LasR/3-O-C12-HSL. Vyšší hladina LasI

umožňuje produkci většího množství 3-O-C12-HSL, který se podílí na produkci faktorů virulence a zároveň zpětnovazebně ovlivňuje expresi genu *lasI*. Řízení *las* systémem podléhá produkce proteáz LasB a LasA, exotoxinu A a proteinů sekrečních drah *P. aeruginosa* (van Delden a Iglewski 1998).

*Rhl* signální systém kontroluje mimo jiné produkci rhamnolipidů. Funkční struktura je analogická *las* systému. Protein RhlI má autoindukční funkci v syntéze N-butyryl-homoserin laktonu (C4-HSL), gen *rhlR* kóduje aktivátor transkripce. Systém reguluje expresi *rhlAB* operonu, který kóduje rhamnosyltransferázu, klíčový enzym v produkci rhamnolipidů. Dále se *Rhl* systém uplatňuje při produkci proteáz LasB, LasA a alkalické proteázy a pyocyaninu (van Delden a Iglewski 1998).

*PQS* (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon) je syntetizován proteiny kódovanými *pqsABCD* operonem. Molekula vzniká kondenzací antranilanu a  $\beta$ -ketolaurátu. Protein PqsH modifikuje vzniklý 2-heptyl-4-chinolon (HHQ) na 2-heptyl-3-hydroxy-4-chinolon. HHQ i PQS mají funkci signálních molekul (Bazire a kol. 2009).

### 1.3.2 Sekreční systémy

Pro průnik do vnitřního prostředí hostitele a setrvání v něm využívá *P. aeruginosa* řady invazinů s funkcí toxinů a lytických enzymů. K jejich transportu slouží řada sekrečních systémů (van Delden 2004).

#### Sekreční systém I

Sekreční systém typu I (T1SS, TOSS) má jednoduchou stavbu, v podstatě je to kanál procházející vnitřní i vnější membránou (Lee a kol. 2005). Zprostředkovává transport jednodušších molekul jako jsou ionty či menší proteiny. *P. aeruginosa* využívá sekreční systém I pro produkci alkalické proteázy (van Delden 2004).

#### Sekreční systém II

Sekreční systém typu II (T2SS) umožňuje transport většiny faktorů virulence *P. aeruginosa* – proteáz, exotoxinu A, fosfolipázy C. Sekretované proteiny jsou syntetizovány jako prekurzory. N-terminální konec je rozpoznán sekretiny, které transportují látku přes cytoplazmatickou membránu. V periplazmatickém prostoru proteiny dostávají konečnou podobu a Xcp systém sekretuje proteiny do okolí (Lee a kol. 2005).

### Sekreční systém III

Další část metabolicky aktivních látek (exoenzym S, exoenzym U, exotoxin T) je pomocí sekrečního systému III (TTSS) injektována přímo do hostitelské buňky (Ader a kol. 2005). TTSS je kódován 36 geny, jejichž produkty se skládají v sekreční aparát a translokon. Sekreční aparát přeneše toxiny přes buněčnou stěnu bakterie a translokon je zodpovědný za injekci toxinu do hostitelské buňky. Nutný je blízký kontakt s cílovými buňkami, avšak účinek toxinů je velmi rychlý (Lee a kol. 2005).

## 1.4 Faktory virulence *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* disponuje řadou faktorů virulence. Jsou to jak struktury na povrchu buňky, tak extracelulární látky (Stehling a kol. 2008). Sekretované látky jsou z chemického hlediska bílkoviny (proteázy, exotoxin A), glykolipidy (rhamnolipidy), polysacharidy (alginát) nebo aromáty (pyocyanin). Přehled jednotlivých faktorů virulence je uveden v tabulce 1.

**Tabulka 1:** Faktory virulence *P. aeruginosa*, převzato z Wilson a kol. (2010), upraveno.

Faktor virulence	Funkce
motilita ( <i>swimming, twitching, swarming</i> )	dosažení preferovaného místa (uplatňuje se především v oblastech s prouděním tekutin nebo gradientem živin)
adheziny (pili typu IV, nefimbriální adheziny)	vazba na hostitelské buňky, vazba na inertní povrchy (např. lékařské vybavení)
proteázy (LasA, LasB, proteáza IV, alkalická proteáza)	překonání ochranných bariér hostitele, degradace pojivové tkáně a složek imunitního systému
siderofory (pyoverdiny, pyochelin)	vychytávání biologicky dostupného železa
pyocyanin	toxické poškození tkáně, ochrana před reaktivními formami kyslíku
hemolyziny (fosfolipáza C, rhamnolipidy)	poškození buněčných membrán, poškození tkání
LPS	interakce s imunitním systémem hostitele
alginát	adheze, ochrana před imunitním systémem hostitele
exotoxin A	inhibice proteosyntézy, buněčná smrt
exoenzym S, exoenzym T, exoenzym U	poškození cytoskeletu, poškození buněčných membrán
efluxní systémy enzymy degradující antibiotika	antibiotická rezistence
biofilm	ochrana před účinky antibiotik a imunitním systémem hostitele

### 1.4.1 Adheziny

Vazba bakterie k epiteliím hostitele je nezbytným krokem při kolonizaci pacienta a rozvoji infekce (Walker 1998). *P. aeruginosa* je schopna adherovat nejen na epiteliu, ale i na inertní povrchy – sklo, kov a plasty (Burrows 2005, van Delden 2004). Adhezi pseudomonád značně podporuje přítomnost zranění či infekce v dané oblasti. Zavedení katétru vede k traumatizaci okolní tkáně a povrch katétru je vhodným prostředím pro adhezi bakterií, tvorbu biofilmu a přenos mikrobů do vnitřního prostředí makroorganismu (Trautner a Darouiche 2004). Přisednutí mikroba je zprostředkované pili typu IV a nefimbriálními adheziny (Palleroni 2005).

#### Pili typu IV

Pili typu IV jsou struktury na povrchu buňky 5 nm silné a 100 nm dlouhé, složené z pilinů (Votava 2005). Strukturální funkci plní protein PilA, další piliny (PilE, PilV, PilW, FimT, FimU) se podílí na pohybu pilu a adhezi (Burrows 2005).

Pili typu IV jsou organelami pohybu, jejich přítomnost umožňuje trhavý pohyb bakterií – *twitching* motilitu (viz kapitola 1.4.2). Zároveň jsou důležitými adheziny bakterií. Jsou nezbytné pro vazbu k inertním (O’Toole a Kolter 1998) i nativním povrchům (Farinha a kol. 1994). Vysokou afinitu mají k receptorům asialo-GM<sub>1</sub> a asialo-GM<sub>2</sub>, které jsou součástí mucinu v plicích. Vazebné místo na epitelu je odhaleno poté, co proteázy rozštěpí ochrannou vrstvu fibronektinu (Walker 1998).

#### Nefimbriální adheziny

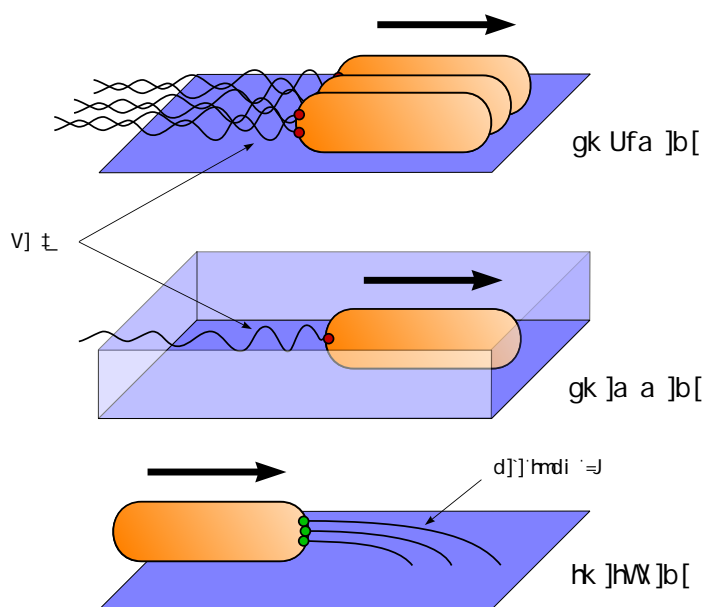
Nefimbriální adheziny (alginát, bičíky, proteiny vnější membrány) vážou substráty, které mají svůj specifický receptor na eukaryotické membráně (Irvin 2008). Celý komplex substrát – adhezin – bakterie se takto může navázat na epiteliu hostitele. Bičíky se uplatňují při adhezi k mucinu. Vazbu zprostředkovávají flagelin a protein čepičky FliD (van Delden a Iglewski 1998). Z extracelulárních produktů slouží jako adhezin především alginát (Ondrovčík 2003, Walker 1998).

### 1.4.2 Pohyblivost

Organely pohybu umožňují bakterii pronikat z vnějšího prostředí do hostitelských tkání a šířit se do preferovaných míst. Jejich úloha byla prokázána při vzniku močových infekcí u katétrizovaných pacientů (Nickel a kol. 1985), důležitou roli hrají i při tvorbě biofilmu



(Mah a O'Toole 2001). Motilitu umožňují bičíky a pili typu IV. Jednotlivé typy pohybu *P. aeruginosa* jsou znázorněny na obrázku 4.



**Obrázek 4:** Jednotlivé typy pohybu *P. aeruginosa*, převzato z Kearns (2010), upraveno. *Swarming* motilita – koordinovaný pohyb celé skupiny buněk, *swimming* motilita – plavání v tekutém médiu pomocí bičíků, *twitching* motilita – pohyb na rozhraní pevných fází pomocí pilů typu IV.

### Pohyb pomocí bičíků (*swimming* motilita)

Bičíky umožňují bakteriím plavat ve vodě a v řídkých médiích (Köhler a kol. 2000). Bičíky jsou ukotvené pomocí bazálního tělíska v cytoplazmatické membráně a buněčné stěně. Do vnějšího prostoru ční háček a vlákno (Votava 2005). U většiny mikrobů se buňka pohybuje vpřed, pokud se bičík, resp. bičíky, otáčí proti směru hodinových ručiček (McKane a Kandel 1996).

Přítomnost bičíků je důležitá především v raných fázích infekce a při akutních onemocněních. Podílejí se na adhezi k hostitelským buňkám a při tvorbě biofilmu (O'Toole a Kolter 1998). Naproti tomu kmeny chronicky infikovaných osob bývají často zcela nepohyblivé (Wolfgang a kol. 2004).

## Swarming motilita

*Swarming* je koordinovaný pohyb celé populace buněk po povrchu ve viskózním prostředí (0,5–0,7% agar). *Swarming* motilita je nejrychlejší způsob pohybu (až několik  $\mu\text{m}$  za sekundu). Buňky pseudomonád schopné *swarming* motility mění svou morfologii, jsou delší a mají zpravidla dva terminální bičíky. Produkce surfaktantů (rhamnolipidů) snižuje povrchové napětí a zlepšuje pohyblivost. Mutace v produkci rhamnolipidů vedou k neschopnosti *swarming* motility (Overhage 2007). Rotace bičíku se mění na pravotočivou, otáčení bičíku po směru hodinových ručiček pak umožňuje změnu z plavání na *swarming*. V médiu se vytváří typické dendritické útvary, nejsou však přítomny kaskády jako u proteů, protože pohyb je kontinuální (Verstraeten a kol. 2008).

## Pohyb pomocí pilů typu IV (*twitching* motilita)

Pili typu IV umožňují trhavý pohyb bakterie na rozhraní pevných fází – *twitching* motilitu (Burrows 2005). Pohyb je poměrně rychlý, až  $1 \mu\text{m/s}$ . Na povrchu bakterie jsou tisíce pilů, každý je však zcela nezávislý na ostatních. Pohyb pilu je sponzorován energií z rozkladu ATP a spočívá v připojování, resp. disociaci podjednotek pilinů. Pokud se piliny odštěpují, dochází ke stažení pilu, analogicky pokud jsou vázány nové podjednotky, pilus se roztahuje. Pohyb pomocí pilů je analogický panožkovitému pohybu – natažený pilus přichytí k podkladu a po zkrácení pilu se buňka přitáhne vpřed (Kearns 2010). Pili se uplatňují i při vzniku biofilmu, především při tvorbě mikrokolonií (O'Toole a Kolter 1998).

### 1.4.3 Proteázy

*P. aeruginosa* sekretuje několik velmi účinných proteáz, které poškozují hostitelské tkáně. Jednotlivé proteázy – LasB elastáza, LasA, alkalická proteáza a proteáza IV – štěpí komponenty pojivové tkáně (fibrin, elastin), degradují imunitní proteiny (složky komplementu, imunoglobuliny) a modulují odpověď organismu (Palleroni 2005, van Delden 2004, Walker 1998).

#### Elastáza

LasB elastáza je důležitým faktorem virulence vyskytujícím se u většiny kmenů *P. aeruginosa* (Iglewski 1996, Stehling a kol. 2008). Proteáza obsahuje atom zinku. Štěpí elastin, fibrin, kasein, IgG, IgA a složky komplementu (Palleroni 2005, Schultz a Miller 1974). Rozkládá dokonce ochranné látky, které brání plicní tkáň před proteázami (van Delden

a Iglewski 1998). Elastin je zodpovědný za pružnost tkání jako jsou plicní alveoly nebo stěny cév. Produkce elastázy vede k hemorragiím a destrukci tkáně (Mittal a kol. 2009).

### **LasA proteáza**

V součinnosti s enzymy bakterie (LasB, alkalickou proteázou) i hostitelského organismu (elastázou neutrofilů) se enzym podílí na degradaci elastinu. K detekci enzymu je využívána jeho stalylytická aktivita (van Delden 2004).

### **Alkalická proteáza**

Alkalická proteáza je metaloenzym štěpící interleukin 2, složky komplementu, fibrin a fibronektin. Navozuje imunopresi (inaktivuje interferon  $\gamma$  a tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ ) a podílí se na nekróze tkání (van Delden 2004, Walker 1998).

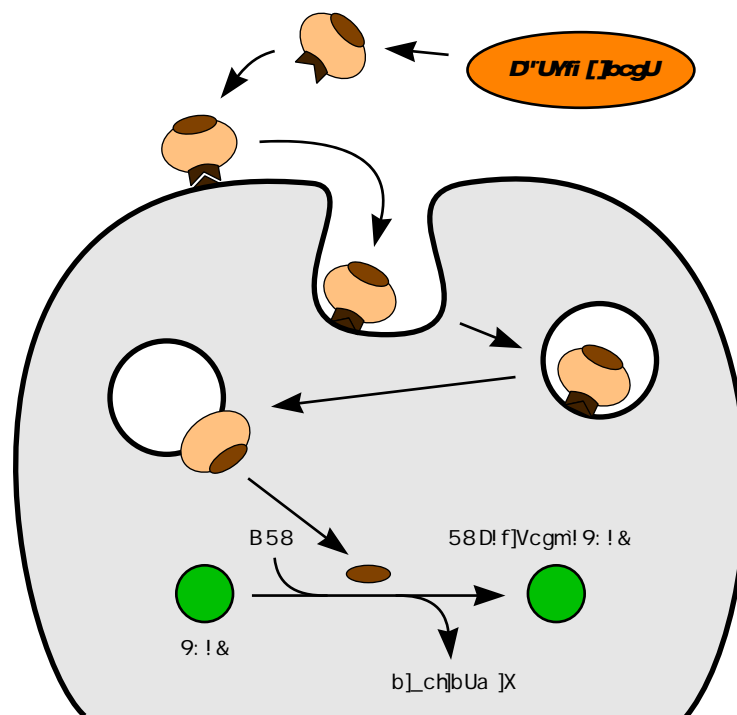
### **Proteáza IV**

Proteáza IV je serinová proteáza degradující IgG, C1q a C3 složky komplementu, fibrinogen, plazmin a plazminogen (van Delden 2004).

## **1.4.4 Exotoxin A**

Exotoxin A (ETA) je jedním z nejdůležitějších faktorů virulence *P. aeruginosa*, jenž je produkován většinou kmenů (Iglewski 1996, Stehling a kol. 2008). Střední letální dávka pro myš je 0,2  $\mu\text{g}$  čistého proteinu. ETA katalyzuje kovalentní přenos ADP-ribózy z NAD na elongační faktor 2 hostitelské buňky, čímž blokuje správný průběh proteosyntézy. Enzym má tři domény (viz obrázek 5). První zprostředkovává vazbu k receptoru hostitelské buňky a napomáhá endocytóze molekuly. Funkcí druhé domény je uvolnění toxinu z endozómu do cytoplazmy a třetí doména katalyzuje vlastní přenos ADP-ribózy na elongační faktor 2 (Walker 1998).

ETA je zodpovědný za odumírání buněk (navození mitochondriálních dysfunkcí, produkce superoxidového aniontu, indukce apoptózy) a lokální poškození tkání. Podílí se na bakteriální invazi a snad i potlačení imunitní reakce hostitele. Poškozuje plicní tkáň u pacientů s CF a je důležitý při rozvoji infekce oka (Pillar a Hobden 2002, van Delden 2004).



**Obrázek 5:** Mechanismus působení tříložkového toxinu ETA, převzato z Wilson a kol. (2010), upraveno. Jednotlivé domény jsou zodpovědné za vazbu k receptoru hostitelské buňky (tmavě hnědá doména), intracelulární transport a uvolnění z endozómu (béžová doména) a vlastní toxické působení při syntéze proteinů (hnědá doména); EF-2 – elongační faktor 2.

### 1.4.5 Exoenzym S, exoenzym T a exotoxin U

Exoenzym S (ExoS) a exoenzym T (ExoT) jsou bifunkční proteiny s ribozyltransferázovou aktivitou a rho-GTPázovou aktivitou. Váží proteiny s afinitou ke GTP, které se podílí na funkci lysozymů. Sekrece ExoS a ExoT tak může chránit mikroba před polymorfonukleáry a makrofágy (Walker 1998). Exoenzymy ovlivňují proteosyntézu, podílí se na destrukci plicních alveol a šíření infekce (van Delden 2004). Umožňují reorganizaci cytoskeletu, zasahují do signálních drah a navozují apoptózu (Lee a kol. 2005). Produkce ExoS ohrožuje především pacienty s plicním onemocněním, u nichž indukuje tvorbu prozánětlivých cytokinů a stimuluje proliferaci lymfocytů (Lee a kol. 2005).

Exoenzym U je fosfolipáza poškozující buněčné membrány (Sato a Frank 2004). Zasahuje rovněž do metabolismu kyseliny arachidonové, čímž podporuje zánětlivou reakci a zvyšuje poškození tkání (Saliba a kol. 2005).

### 1.4.6 Hemolyziny

Hemolyziny jsou produkovány v prostředí s nízkou koncentrací železa. Poškozují různé typy buněk a podílejí se na získávání využitelných živin a iontů železa (Bednář a kol. 1994). *P. aeruginosa* produkuje dva typy hemolyzinů – termolabilní fosfolipázu C a termostabilní rhamnolipidy (Berka a kol. 1981).

#### Fosfolipáza C

Fosfolipáza C (lecitináza) degraduje fosfatidylcholin (lecitin), jednu z hlavních komponent cytoplazmatické membrány. Enzym odebírá polární skupiny z fosfolipidů, destabilizuje buněčnou membránu a tím vnitřní prostředí buňky (Lee a kol. 2005). Fosfolipáza C moduluje imunitní reakci hostitele, zvyšuje permeabilitu cév, podporuje produkci prozánetlivých mediátorů a spolupodílí se na oxidativním vzplanutí neutrofilů. V konečném důsledku vyvolává nekrózy ledvin a jater (van Delden 2004).

#### Rhamnolipidy

Rhamnolipidy jsou glykolipidy obsahující rhamnózu. Uplatňují se při infekcích dýchacích cest, rozpouští plicní surfaktant a činí plicní tkáň náchylnější k degradaci fosfolipázou C. Rhamnolipidy snižují aktivitu ciliárních buněk, inhibují fagocytózu a stimulují produkci mucinu (van Delden a Iglewski 1998, Walker 1998). Rhamnolipidy jsou důležité i pro pohyb mikroba – snižují povrchové napětí a tím umožňují *swarming* motilitu (Overhage 2007).

### 1.4.7 Siderofory

Železo je jako součást řady metabolicky aktivních látek esenciálním prvkem pro všechny organizmy (Andrews a kol. 2003). *P. aeruginosa* je schopná získat  $\text{Fe}^{3+}$  ionty z komplexních sloučenin eukaryotického organismu (laktoferinu, transferinu) nebo využít siderofory produkované jinými organizmy (xenosiderofory). Zachycené  $\text{Fe}^{3+}$  ionty jsou ve vnitřním prostředí mikroba redukovány na železnaté ionty využitelné buňkou (Cornelis 2010). Dostatek železa je nezbytný pro oxidačně-redukční pochody v buňce, tvorbu energie nebo pro vyžrávání biofilmu. Vyšší koncentrace železa zvyšuje virulenci mikroba (Bednář a kol. 1994, Singh a kol. 2002).

K vylučování železitých iontů sekretuje *P. aeruginosa* dva typy sideroforů – pyoverdiny a pyochelin (Cornelis 2010).

## Pyoverdiny (fluoresceiny)

Pyoverdiny jsou skupina fluorescentních peptidů. Molekula pyoverdinu je složena z chromoforu (derivát chinolonu), peptidového řetězce a acylového řetězce (Meyer 2000). V peptidovém řetězci, nejvariabilnější části molekuly, se vyskytují D-aminokyseliny, pravděpodobně jako ochrana před proteázami (Palleroni 2005). Pseudomonády lze podle schopnosti produkovat pyoverdiny rozdělit na druhy fluorescentní (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. syringae*) a nefluorescentní (*P. stutzeri*, *P. mendocina*) (Holt a kol. 1994). Každý druh z rodu *Pseudomonas* produkuje vlastní typ pyoverdinu, čehož je využíváno při taxonomických studiích, tzv. siderotypizaci (Fuchs a kol. 2001). Makroskopicky se produkce pyoverdinu projeví jako žlutozelené zbarvení okolního média, jež je schopno fluorescence, pokud je vystaveno krátkovlnnému záření (Meyer 2000).

## Pyochelin

V menší míře mikrob produkuje pyochelin (Cornelis 2010). Molekula je jako nahnědlý pigment sekretována do prostředí, kde se kromě vychytávání  $\text{Fe}^{3+}$  iontů účastní příjmu i jiných kovů (afinitu má také ke dvojmocným iontům zinku, mědi, kobaltu a dalších kovů) (Brandel a kol. 2012). Chelátor je aktivní především při nižším pH a celkově je jeho afinita k  $\text{Fe}^{3+}$  iontům nižší než u pyoverdinů. Pyochelin má prooxidativní účinky a podílí se na zánětlivých procesech hostitelského organismu (Cornelis 2010).

### 1.4.8 Pyocyanin

Produkce rozpustného barviva pyocyaninu dala druhové jméno bakterii *Pseudomonas aeruginosa* – *aerugo* označuje zelenou barvu oxidované mědi. Stejně zbarvení má i hnis v ráně infikované *P. aeruginosa* (Ondrovčík 2003) a hlen z plic pacientů s CF (Liu a Nizet 2009).

Pyocyanin je modrozelený derivát fenazinu – metylhydrofenazin (Rosypal a Hoďák 1981). Je rozpustný ve vodě i v chloformu (Mára 1972), čehož se využívá při jeho stanovení. Barva pyocyaninu závisí na pH, v alkalickém prostředí je bezbarvý, přes žlutou přechází až do červené v kyselém prostředí.

Jeho produkce podléhá řízení QS systémem (Dietrich a kol. 2006). Pyocyanin umožňuje získávat anorganický fosfát (Palleroni 2005) a podílí se na vychytávání iontů železa (Walker 1998). Pyocyanin je toxický pro živočišné tkáně. Váže se na flavoproteiny cytochromového řetězce, zasahuje do transportu elektronů a zvyšuje intracelulární množství reaktivních forem kyslíku. Narušuje transport iontů a sekreci hlenu, inhibuje

pohyb cílií, potlačuje reakci imunitního systému a indukuje apoptózu zasažených buněk (Jacob a kol. 2011, Liu a Nizet 2009). Oxidované deriváty pyocyaninu (převážně  $\alpha$ -oxyfenazin) mají antibiotický účinek na grampozitivní bakterie (Mára 1972).

### 1.4.9 Lipopolysacharid

Lipopolysacharid (LPS) je jednou za základních složek vnější membrány gramnegativních bakterií. Skládá se z vlastní toxické části – lipidu, dřevné oblasti a druhově specifického polysacharidu (O antigen kmene). LPS (endotoxin) se uvolňuje při rozpadu buňky. Endotoxin *P. aeruginosa* je méně toxický než u ostatních gramnegativních druhů bakterií (Iglewski 1996), přesto indukuje imunitní odpověď hostitele (infiltraci polymorfonukleárů, produkci cytokinů) a ve vysokých koncentracích vede k toxickému šoku (Morrison a Ryan 1987).

### 1.4.10 Alginát

Alginát je polysacharid tvořený  $\beta$ -D-manuronovou kyselinou a jejím 5' epimerem – kyselinou  $\alpha$ -L-guluronovou (Murray a kol. 2002). Podílí se na adhezi buněk, chrání mikroba před opsonizací, fagocytózou, cytotoxickým účinkem polymorfonukleárů a inhibuje účinek aminoglykosidů (Murray a kol. 2002, Walker 1998). Alginát je nejhojnějším exopolysacharidem v matrix biofilmu (Mah a O'Toole 2001).

Produkce většího množství alginátu je typická pro mukoidní izoláty z plic. Plíce bývají kolonizovány nemukoidními kmeny, avšak záhy dochází ke změně na mukoidní fenotyp (Walker 1998). Konverze je dána inaktivační mutací v genu *mucA*, který kóduje anti- $\sigma$  faktor AlgT (Hentzer a kol. 2001). Pokud není  $\sigma$  faktorem blokován přepis genů, vzniká AlgD, enzym s GDP-manózydehydrogenázou aktivitou, který má klíčovou roli při syntéze alginátu (Walker 1998).

### 1.4.11 Biofilm

Schopnost tvořit biofilm je závažným faktorem virulence (Kobayashi a kol. 2009, Mah a O'Toole 2001, Ryder a kol. 2007). Problematice biofilmu se vědci intenzivně věnují posledních 30 let, přičemž pseudomonády patří k modelovým organismům pro studium biofilmu. Přetrvávání bakterií v podobě biofilmu a recidivy infekce jsou vážným problémem soudobé klinické medicíny (Breidenstein a kol. 2011, Cogan a kol. 2011).

Biofilm je společenstvo bakteriálních buněk, které jsou obklopené extracelulární

hmotou (Costerton 1999). V lidském těle se biofilm tvoří především na inertních površích (katétrů, intubační kanyly, kloubní náhrady). Přejed z planktonické formy na přisedlou je indukován nedostatkem živin a prostoru, nebo stresem (osmotický stres, imunitní reakce hostitele) a je řízen QS systémem skrz regulaci hladiny c-di-GMP (Verstraeten a kol. 2008). Planktonické buňky adherují a zvyšuje se produkce extracelulárních polysacharidů (především alginátu) tvořících matrix biofilmu, které kotví mikroby k povrchu (Tenke a kol. 2006). Schopnost vytvářet biofilm však byla prokázána i izolátů, jež nesyntetizují alginát. V takových případech přebírají dominantní roli exopolysacharidy *psl* a *pel* (Mittal a kol. 2009). Detailní struktura obou polysacharidů není známa. *Psl* polymer je bohatý na manózu a galaktózu.

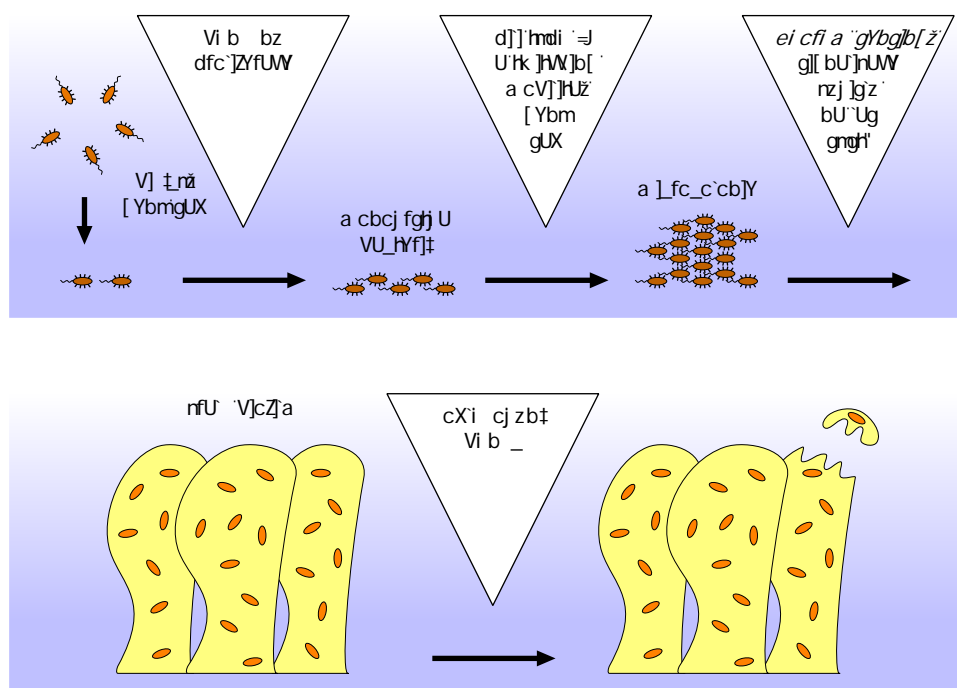
V raných fázích tvorby biofilmu jsou nezbytné bičíky a pili typu IV (O'Toole a Kolter 1998), které se jakožto adheziny podílejí na vazbě k povrchu. Bičíky zprostředkovávají pohyb po povrchu, na kterém se následně vytváří jednovrstevný povlak bakterií. Pohyb pomocí pilů umožňuje formování mikrokolonií hřibovitého tvaru. Bakterie schopné *twitching* motility jsou na vrcholu hřibu, mutanty v produkci pilů pak tvoří základnu – nohu hřibu (Costerton 1999). Přisednutí a tvorbu mikrokolonií řídí geny *sad* – *surface attachment defective* (Verstraeten a kol. 2008). Vyvrálý biofilm je prostorovou strukturou tvořenou mikrokoloniemi a extracelulární hmotou. Ze zralého biofilmu se uvolňují jednotlivé buňky i celé shluky bakterií, které jsou příčinou častých recidiv při léčbě biofilmových infekcí. Schéma vzniku biofilmu od počáteční adheze k uvolňování buněk ze zralého biofilmu je zobrazeno na obrázku 6.

Vyvráváním biofilmu získávají mikroorganizmy fenotyp odlišný od planktonických forem. Zvyšuje se odolnost k mechanickému poškození, zároveň je biofilm ideální ochranou před bakteriofágy, imunitními buňkami hostitele i antimikrobiálními látkami (Donlan a Costerton 2002). Buňky v podobě biofilmu odolávají dávce antibiotika vyšší o několik řádů než planktonické formy (Costerton 1999). Možné příčiny vyšší rezistence jsou uvedeny v kapitole 1.4.12.

## Aerovaný biofilm

Nově se pozornost vědců upíná i k blance biofilmu na povrchu kapalného media – aerovanému biofilmu (v anglické literatuře *air-liquid interface biofilm* nebo *pellicle*). Přítomnost aerovaného biofilmu byla detekována jak u gramnegativních mikrobů – *Actinobacillus* spp. (Kaplan a Mulks 2005), *Escherichia* spp., *Salmonella* spp. (Martí a kol. 2011) a *Pseudomonas* spp. (Koza a kol. 2009), tak u grampozitivních rodů – např. u rodu *Bacillus* (Houry a kol. 2010, Chagneau a Saier 2004). Vrstva na rozhraní kapaliny a vzduchu obsahuje nejvíce kyslíku, avšak zdroje živin mohou být limitovány (Koza a kol. 2009).





**Obrázek 6:** Tvorba a vyzrávání biofilmu, převzato z Costerton a kol. (1999), upraveno. Buňky nejprve nasedají na povrch pomocí adhezinů. Společenstvo vytváří jednovrstevný povlak a následně hříbovitě struktury. Zralý biofilm tvoří mikrokolonie bakterií obklopené extracelulární hmotou s četnými kanálky. V závěrečných fázích dochází k uvolňování buněk z biofilmu a šíření mikrobu v těle hostitele.

Přítomnost kyslíku je u některých druhů nezbytná pro rozvoj aerovaného biofilmu (Liang a kol. 2010). Aerovaný biofilm není u všech kmenů stejný, Koza a kol. (2009) popsali několik typů aerovaného biofilmu u rodu *Pseudomonas* v závislosti na síle vrstvy a charakteru a kompaktnosti hmoty.

#### 1.4.12 Rezistence k antibiotikům

K léčbě pseudomonádových infekcí se používají protipseudomonádové peniciliny – piperacilin (i v kombinaci s tazobaktamem); cefalosporiny III. a IV. generace – ceftazidim, cefepim; karbapenemy – imipenem, meropenem; aminoglykosidy – gentamicin, amikacin a fluorochinolony – ciprofloxacin, levofloxacin (Palleroni 2005).

Na vzniku rezistence pseudomonád k antibiotické léčbě se podílí více mechanismů. Bakteriální obaly jsou celkově málo propustné a mutace v porinových proteinech dále snižují propustnost buněčné stěny pro  $\beta$ -laktamy, aminoglykosidy i fluorochinolony (Gowan

1999). Permeabilita buněčné stěny *P. aeruginosa* dosahuje v porovnání s *E. coli* pouze 8 % (Liptáková a kol. 2005).

Bakterie disponuje výkonnými efluxními pumpami, které aktivně čerpají antibiotikum (ATB) z buňky (Gowan 1999). Efluxní pumpy jsou tříložkovými proteinovými systémy (Livermore 2002). Vlastní pumpa, která získává energii z rozkladu ATP, je ukotvena v cytoplazmatické membráně, zbylé dva proteiny jsou lokalizovány v periplazmatickém prostoru a ve vnější membráně. Substrátová specifita efluxních pump zahrnuje prakticky všechna ATB používaná k léčbě pseudomonádových infekcí. Spolu s nízkou propustností membrány a změnou cílové molekuly jsou efluxní pumpy zodpovědné za neenzymatickou složku rezistence pseudomonád (Strateva a Yordanov 2009).

Změna cílové struktury se uplatňuje při vzniku rezistence k chilononovým antibiotikům. Mutace v genu *gyrA* mění bakteriální topoisomerasu II, cílové místo fluorochinolonů (Gowan 1999).

Pseudomonády produkují enzymy s degradačními účinky –  $\beta$ -laktamázy, adenylázy a fosforylázy (Gowan 1999). Enzymy se podílejí na degradaci aminoglykosidů a  $\beta$ -laktamů.  $\beta$ -laktamázy identifikované u *P. aeruginosa* zahrnují širokospektré  $\beta$ -laktamázy (ESBL),  $\beta$ -laktamázy typu AmpC i karbapenemázy (metalo- $\beta$ -laktamázy) (Hrabák a kol. 2009). ESBL hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny všech generací a monobaktamy. Jsou inhibovány inhibitory  $\beta$ -laktamáz (např. kyselinou klavulanovou).  $\beta$ -laktamázy typu AmpC štěpí peniciliny, cefamyciny, většinu cefalosporinů a monobaktamy. Jsou inhibovány kyselinou boritou. Karbapenemázy jsou enzymy schopné degradovat karbapenemová antibiotika (imipenem, meropenem), peniciliny a cefalosporiny, ale nehydrolyzují monobaktamy. Metallo- $\beta$ -laktamázy (MBL) mají v aktivním místě kovový iont (obvykle zinek), jenž je donorem molekuly vody při hydrolýze amidové vazby  $\beta$ -laktamového kruhu.

Rezistence k jednotlivým ATB se může vyvinout i během léčby. Schopnost kombinovat jednotlivé mechanismy rezistence umožňuje selekci multirezistentních kmenů (Liptáková a kol. 2005). Procento multirezistentních kmenů v nemocničním prostředí z celkového záchytu bývá v 0,6–32 % v závislosti na lokalitě a typu sledování (Obritsch a kol. 2005). Od roku 2005 je surveillance antibiotické rezistence *P. aeruginosa* v České republice sledována v rámci projektu EARSS – *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS 2012). V rozmezí let 2007–2010 byl zaznamenán pokles citlivosti invazivních izolátů k piperacilinu a ceftazidimu, citlivost kmenů k ciprofloxacinu, gentamicinu a karbapenemům zůstává stabilní.

## Rezistence v biofilmu

Schopnost mikroba růst ve formě biofilm snižuje účinnost antibiotické léčby a je příčinou častého selhávání antimikrobiální terapie (Costerton 1999, Trautner a Darouiche 2004). Buňky uvnitř biofilmu jsou rezistentní k vyšším koncentracím antibiotik než planktonické buňky. Vyšší rezistence může být způsobena nižší metabolickou aktivitou buněk a sníženou penetrací látek díky nepropustné extracelulární hmotě (např. pro vysokomolekulární ATB nebo molekuly imunitního systému) (Mah a O'Toole 2001). Negativní náboj extracelulární hmoty vyvazuje některá ATB, např. ciprofloxacín (Suci a kol. 1994) nebo aminoglykosidy (Hatch a Schiller 1998). Fluorochinolony prostupují biofilmem s určitou časovou prodlevou danou nasycením vazebných míst. Metabolický útlum podporuje vznik tzv. perzistorů, tedy buněk více odolných k antimikrobiálním látkám. Mechanismus vzniku perzistorů však nebyl zatím uspokojivě vysvětlen. Kultivací perzistorů vzniká populace se stejnou citlivostí k ATB jako původní kultura (část buněk je citlivá, z malé části vznikají nové perzistori). Buňky v biofilmu jsou schopné produkovat degradační enzymy jako kataláza nebo  $\beta$ -laktamázy (Mah a O'Toole 2001). Biofilm není homogenní hmotou a v rámci jeho struktury vznikají gradienty živin, kyslíku i odpadních metabolitů. Heterogenita populace se projevuje různou rychlostí růstu nebo odlišným fenotypem jednotlivých buněk, které tak rovněž vykazují odlišnou citlivost k vnějším zásahům. Buňky v biofilmu mají také odlišnou expresi genů než jejich planktonické protějšky a v biofilmu je taktéž přítomno vyšší procento buněk schopných tvořit SCVs (Starkey a kol. 2009).

Tyto mechanismy se mohou vzájemně doplňovat, např. zpomalení difúze antibiotika s produkcí  $\beta$ -laktamáz (Giwercman a kol. 1991).

## Antibiotické zátky

Koncept antibiotické zátky (ATB zátky) jako alternativy ke konvenční léčbě katéetrových infekcí vznikl v 80. letech minulého století (Messing a kol. 1988). Katéetrové infekce jsou často obtížně léčitelné díky perzistenci bakterií v podobě biofilmu (del Pozo 2009, Maharaj a kol. 2008). Infekce močových a centrálních žilních katétrů jsou zpravidla řešeny odstraněním katétru (Maharaj a kol. 2008). Výměna tunelizovaných katétrů nebo implantovaných portů je náročnější (vyjmutí a opětovné zavádění katétru může poškodit nervy nebo vést k hemoragiím) a při méně závažných infekcích je katétr často ponechán a infekce je řešena podáním ATB (del Pozo 2009), přičemž lze využít techniku antibiotické zátky. Systémově podaná ATB mnohdy nemohou působit v dostatečné koncentraci na mikrobiální ložisko uvnitř katétru. Při použití techniky ATB zátky jsou použité koncentrace ATB jsou natolik vysoké, že nemohou být použity systémově. Vysoké koncentrace ATB

(1–5 mg/ml) spolu s delší dobou působení (zpravidla 12–24 hod) umožňují eradikaci mikrobiální kolonizace v lumen katétru. Po skončení terapie je roztok ATB zátky vypláchnut fyziologickým roztokem a aplikace ATB zátky je opakována v pravidelných intervalech (del Pozo 2009).

Množství studií zkoumá účinky ATB zátek s využitím různých ATB (popř. etanolu), v odlišných koncentracích i dobách působení (Metcalf a kol. 2004, Opilla a kol. 2007, Sherertz a kol. 2006). Další studie hodnotí účinek zátky v kombinaci s použitím heparinu nebo citrátu sodného jako antikoagulačního činidla (Maharaj a kol. 2008, Takla a kol. 2007). Technika ATB zátky se zdá být účinnou proti gramnegativním a grampozitivním mikrobům i proti kvasinkám (Maharaj a kol. 2008, Opilla a kol. 2007, Sherertz a kol. 2006). Manuál *Infectious Diseases Society of America* zařadil techniku ATB zátky jako možnost léčby intraluminální infekce, pokud je katétr ponechán v těle pacienta, a jako profylaxi pro vybrané typy pacientů (del Pozo 2009).

Přestože je technika ATB zátky slibnou možností léčby katérových infekcí, její užití v klinické praxi je vnímáno jako kontroverzní. V současnosti není k dispozici žádný podrobný manuál pro použití konkrétních koncentrací ATB ani antikoagulancií. Především použití etanolu jako zátky je u části pacientů spojeno s vedlejšími účinky (zvracení, bolest hlavy) (del Pozo 2009). Sousa a kol. (2011) dále zmiňují možnost rozvoje rezistence. Existuje pouze málo studií *in vivo* a bude nutné nejprve zpracovat velké randomizované studie (del Pozo 2009).

## 2 CÍL PRÁCE

Jednotlivé kmeny *P. aeruginosa* disponují různými faktory virulence, které se rozhodující měrou podílejí na propuknutí infekce a možnostech její následné léčby. Cíle práce zahrnují detekci vybraných faktorů virulence (tvorba biofilmu, pohyblivost, sekrece extracelulárních látek a antibiotická rezistence) u katérových izolátů *P. aeruginosa*. Dále byl sledován vztah mezi uvedenými faktory virulence a ověřena účinnost antibiotických zátek proti vybraným biofilm-pozitivním kmenům.

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Použité mikroorganizmy

V práci byly použito 175 kmenů *P. aeruginosa* izolovaných z katérových infekcí pacientů Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně (FNUSA), Nemocnice milosrdných bratří (NMB), Masarykova onkologického ústavu (MOÚ) a Centra kardiovaskulární a transplantační chirurgie (CKTCH) v letech 2008–2011. Kmeny byly zařazeny do druhu *Pseudomonas aeruginosa* na základě typického růstu na Endově agaru a krevním agaru. Identifikace byla potvrzena biochemicky pomocí NEFERMtestu 24 a OXItestu (PLIVA-Lachema, Brno, Česká republika). U každého izolátu byl sledován věk a pohlaví pacienta, oddělení a diagnóza. Vzorky byly sbírány z jednotek intenzivní péče a lůžkových oddělení (jeden kmen pocházel z ambulance) výše uvedených klinických zařízení. Izoláty z močových katétrů tvořily 80 % vzorků, zbytek pocházel z infekcí krevních katétrů.

Jako kontrolní kmeny při testování antibiotické citlivosti byly použity *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3996 a *Escherichia coli* CCM 3954.

#### 3.1.2 Kultivační média

Komerčně dostupná kultivační média byla připravována podle přiloženého návodu a v souladu s instrukcemi výrobce. Všechny půdy a roztoky byly připravovány v technickém úseku laboratoří Mikrobiologického ústavu FNUSA z komerčně dostupných směsí nebo z jednotlivých komponent.

##### Endův agar

Výrobce: Hi-Media, Mumbai, Indie.

Složení: 47 g základu pro Endův agar (HiMedia), 4 ml roztoku bazického fuchsinu (2 g bazický fuchsin, 40 ml 95% etanol – pH 7,2), 1000 ml destilované vody.

##### Krevní agar

Složení: 44 g *columbia blood agar base* (Imuna, Šarišské Michalany, Slovenská republika), 5 % defibrinované beraní krve (ZOO servis, Dvůr Králové, Česká republika), 1000 ml desti-

lované vody.

### **Luria-Bertani bujón**

Výrobce: Hi-Media, Mumbai, Indie.

Složení: 10 g enzymatického hydrolyzátu kaseinu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g chloridu sodného, 1000 ml destilované vody.

### **Luria-Bertani médium, varianta pro *swimming* test**

Výrobce: Hi-Media, Mumbai, Indie.

Složení: 10 g enzymatického hydrolyzátu kaseinu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g chloridu sodného, 3 g agaru, 1000 ml destilované vody.

### **Luria-Bertani médium, varianta pro *twitching* test**

Výrobce: Hi-Media, Mumbai, Indie.

Složení: 10 g enzymatického hydrolyzátu kaseinu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g chloridu sodného, 10 g agaru, 1000 ml destilované vody.

### **Mozkosrdcová infúze s přidavkem 4 % glukózy**

Výrobce: Hi-Media, Mumbai, Indie.

Složení: 250 g infúze z hovězího srdce, 200 g infúze z telecího mozku, 10 g proteosového peptonu, 2,5 g hydrogenfosforečnanu (di)sodného, 2 g dextrózy, 5 g chloridu sodného, 40 g glukózy, 1000 ml destilované vody.

### **Mueller-Hinton agar**

Složení: 2 g hovězího výtažku, 17,5 g hydrolyzátu kaseinu, 1,5 g škrobu, 17 g agaru, 1000 ml destilované vody.

### **Mueller-Hinton agar s oxacilínem**

Složení: 2 g hovězího výtažku, 17,5 g hydrolyzátu kaseinu, 1,5 g škrobu, 17 g agaru, 128 mg oxacilínu, 1000 ml destilované vody.

### **Mueller-Hinton bujón**

Složení: 2 g hovězího výtažku, 17,5 g hydrolyzátu kaseinu, 1,5 g škrobu, 1000 ml destilované vody.

### ***Swarming* agar**

Složení: živný bujón, 5 g glukózy, 5 g agaru, 1000 ml destilované vody.

### **Pseudomonádový agar F**

Výrobce: Hi-Media, Mumbai, Indie.

Složení: 10 g enzymatického hydrolyzátu kaseinu, 10 g proteosového peptonu, 1,5 g hydrogenufosforečnanu (di)draselného, 1,5 g síranu hořečnatého, 15 g agaru, 1000 ml destilované vody, pH 7,0.

### **Pseudomonádový agar P**

Výrobce: Hi-Media, Mumbai, Indie.

Složení: 20 g masového peptonu, 10 g síranu draselného, 1,4 g chloridu hořečnatého, 15 g agaru, 1000 ml destilované vody.

### **Šikmý agar**

Složení: 44 g *columbia blood agar base* (Imuna, Šarišské Michalany, Slovenská republika), 17 g agaru, 1000 ml destilované vody.

## **3.1.3 Chemikálie a roztoky**

V rámci diplomové práce byly použity následující roztoky a chemikálie:

### **Fyziologický roztok**

Složení: 7,5 g chloridu sodného, 1000 ml destilované vody.



**Tris pufr – 100 mmol/l**

Výrobce: Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika.

Složení: 12,11 g *Trizma base*, 1000 ml destilované vody.

**Pufrovaný fyziologický roztok (PBS) – 10 mmol/l**

Výrobce: Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika, desetkrát koncentrovaný roztok.

Složení pracovního roztoku: 1,64 g fosforečnanu sodného, 0,9 g chloridu sodného, 1000 ml destilované vody, pH 7,4.

**Další chemikálie**

- amikacin (injekční roztok *amikacini disulfas* 0,25 mg/ml); Bristol-Myers Squibb, Praha, Česká republika),
- ciprofloxacín (prášek; Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika),
- destilovaná voda (připravována v technickém úseku laboratoří Mikrobiologického ústavu FNUSA),
- etanol – 99,5% roztok (Fargon, Olomouc, Česká republika),
- kongo červeň konjugovaná s elastinem (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika),
- krystalová violet – 5 g krystalové violeti, 200 ml 95% etanolu, 5 g štavelanu amonného, 495 ml destilované vody (Lékárna FNUSA, Brno, Česká republika),
- kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA) – 0,1mol/l, pH 7,8 (Lékárna FNUSA, Brno, Česká republika),
- roztok chloridu vápenatého – 11 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 100 ml destilované vody (Lékárna FNUSA, Brno, Česká republika).
- roztok propraných erytrocytů (erythrocyty – ZOO servis, Dvůr Králové, Česká republika),
- sodná sůl resazurinu (prášek; Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika).

**Antibiotické disky**

Výrobce: Oxoid, Hants, Velká Británie.

K testování citlivosti izolátů k antibiotikům byly použity antibiotické disky s příslušnou koncentrací antibiotika:

- amikacin – 30  $\mu\text{g}$ ,
- amoxicilín-kys. klavulanová – 20 + 10  $\mu\text{g}$ ,
- aztreonam – 30  $\mu\text{g}$ ,
- cefepim – 30  $\mu\text{g}$ ,
- cefoperazon – 75  $\mu\text{g}$ ,
- cefoperazon/sulbaktam – 75 + 30  $\mu\text{g}$ ,
- cefotaxim – 30  $\mu\text{g}$ ,
- cefoxitin – 30  $\mu\text{g}$ ,
- ceftazidim – 30  $\mu\text{g}$ ,
- ciprofloxacín – 5  $\mu\text{g}$ ,
- gentamicin – 10  $\mu\text{g}$ ,
- imipenem – 10  $\mu\text{g}$ ,
- kolistin – 10  $\mu\text{g}$ .
- meropenem – 10  $\mu\text{g}$ ,
- ofloxacin – 5  $\mu\text{g}$ ,
- piperacilin/tazobaktam – 100 + 10  $\mu\text{g}$ ,
- prázdné disky.

### 3.1.4 Komerční identifikační soupravy

NEFERMtest 24 (PLIVA-Lachema, Brno, Česká republika).

### 3.1.5 Pomůcky

Během laboratorní práce byly použity běžné pomůcky pro práci v mikrobiologické laboratoři:

- dispensor (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie),
- filtrační membrána Millex pro sterilizaci roztoků – 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Billerica, USA),
- kahan,
- mikrobiologická klička, mikrobiologická jehla,
- mikrotitrační destičky P pro tkáňové kultury (GAMA group, Trhové Sviny, Česká republika),

- pipeta o nastavitelném objemu (Biohit, Helsinky, Finsko),
- polystyrenové zkumavky (MEUS, Piove di Sacco, Itálie),
- replikátor,
- stojan na zkumavky,
- špičky na pipety (Biohit, Helsinky, Finsko),
- zkumavky typu Eppendorf o objemu 1,5 ml (ABgene, Epsom, Velká Británie).

### 3.1.6 Přístroje

- centrifuga Genofuge 16M (Techne, Stone, Velká Británie),
- densitometr – DensiLA metr (PLIVA-Lachema, Brno, Česká republika),
- digitální váha AND GF-1200 (Váhoservis, Brno, Česká republika),
- digitální fotoaparát Canon G7 (Canon, Tokio, Japonsko),
- lednička (Samsung, Soul, Jižní Korea),
- skener CanoScan LiDE 60 (Canon, Tokio, Japonsko),
- spektrofotometr Multiscan EX, A.A. (Lab-Systems, Ramat-Gan, Izrael),
- termostat (Laboratorní přístroje, Praha, Česká republika),
- vortex (Snijder, Hoorn, Nizozemí).

### 3.1.7 Software

K vyhodnocení získaných dat byl použit software:

- ImageJ 1.45s,
- Statistica (StatSoft, Praha, Česká republika),
- TNW auto 7.0 (PLIVA-Lachema Diagnostika, Brno, Česká republika).

## 3.2 Metody

### Druhová identifikace

Kmeny použité v rámci diplomové práce byly identifikovány biochemicky pomocí komerční soupravy NEFERMtest 24 (PLIVA-Lachema, Brno, Česká republika). Souprava obsahuje

řadu biochemických testů, které umožňují identifikovat gramnegativní nefermentující bakterie z klinického materiálu. Pro *P. aeruginosa* je charakteristická produkce cytochrom-oxidázy, která byla detekována pomocí diagnostických proužků OXItest. Na proužek bylo přeneseno malé množství kultury. Výsledek (změna barvy) byla odečtena po několika minutách. Pro NEFERMtest 24 byla připravena suspenze kultury ve fyziologickém roztoku o denzitě 2 dle McFarlandovy stupnice. Každá jamka mikrodestičky obsahující dehydratované médium s příslušným substrátem a indikátorem byla inokulována 0,1 ml suspenze. Jamky, u kterých to bylo vyžadováno, byly po zakápnuty dvěma kapkami parafinového oleje. Destičky byly inkubovány 24 hodiny při 37 °C. Typické výsledky biochemických testů jsou uvedeny v tabulce 2. Hodnocení reakcí bylo provedeno spektrofotometricky a zpracováno softwarem TNW auto 7.0 (PLIVA-Lachema, Brno, Česká republika). Jako identifikované byly považovány bakterie s identifikačním skóre > 96 % (výborná nebo velmi dobrá identifikace) a T-indexem > 75 % (typický kmen).

**Tabulka 2:** NEFERMtest 24 – typický výsledek pro *P. aeruginosa*

A	B	C	D	E	F	G	H
IND	ARG	URE	LYS	GLU	FRU	INO	SUC
–	+	(+)	–	+	+	–	–
PHS	bGA	bGL	NAG	MAN	XYL	CEL	GAL
(+)	–	–	–	(+)	+	–	(+)
NO <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	ESL	gGT	LAC	MLT	TRE	SCI
+	+	+	–	+	–	–	(–)

+ pozitivní reakce, – negativní reakce, (+) většinou pozitivní reakce, (–) většinou negativní reakce.

IND – indol, ARG – arginin, URE – ureáza, LYS – lysin, GLU – glukóza, FRU – fruktóza, INO – inositol, SUC – sacharóza, PHS – fosfatáza, bGA –  $\beta$ -galaktozidáza, bGL –  $\beta$ -glukozidáza, NAG – N-acetyl- $\beta$ -D-glukózaminidáza, MAN – mannitol, XYL – xylóza, CEL – celobióza, GAL – galaktóza, NO<sub>3</sub> – nitráty, NO<sub>2</sub> – nitrity, ESL – eskulin, gGT –  $\gamma$ -glutamyltransferáza, LAC – laktóza, MLT – maltóza, TRE – trehalóza, SCI – simmons citrát.

### 3.2.1 Uchovávání kmenů

Kmeny byly uchovávány v glycerolserovém bujonu v hlubokomrazícím boxu při teplotě -73 °C a pro vlastní testování byla vždy použita čerstvá 24hodinová kultura na MH agaru.

### 3.2.2 Průkaz pohyblivosti kmene

Ke kvantifikaci jednotlivých typů pohybu byly použity miskové testy s médiem o různém obsahu agaru. Pohyblivost mikroba na příslušném médiu je přímo úměrná velikosti vzniklé zóny. Důležité je použít vždy čerstvý agar. Jednotlivé typy pohybu jsou znázorněny na obrázku 7.

#### *Swimming motility test*

Pro test na *swimming* motilitu bylo využito Luria-Bertani (LB) *swimming* médium s 0,3 % agaru (Deziel a kol. 2001). Inokulace byla prováděna kolmým vpichem bakteriologické jehly dovnitř média. Kultivace probíhala 24 hodin při 37 °C. Výsledek testu byl odečten jako průměr vzniklé zóny (obrázek 7 – A, B), který byl následně přepočítán na plochu.

#### *Twitching motility test*

K testování *twitching* motility byly použity plotny s čerstvým LB *twitching* médiem s 1 % agaru (Zolfaghar a kol. 2003). Kultura byla inokulována kolmým vpichem bakteriologické jehly na dno misky, kde se buňky pohybovaly na rozhraní pevných fází. Plotny byly inkubovány 16 hodin při 37 °C a 72 hodin při pokojové teplotě. Po kultivaci byl agar vyklopen a otisk na dně misky fixován sušením. Pro snazší hodnocení byl otisk barven roztokem krystalové violeti (15 min). Nenačtené barvivo bylo vymyto proudem vody, misky byly vysušeny a snímány skenerem (obrázek 7 – C, D). K odečtu *twitching* motility byl použit software ImageJ (Rasband 2011).

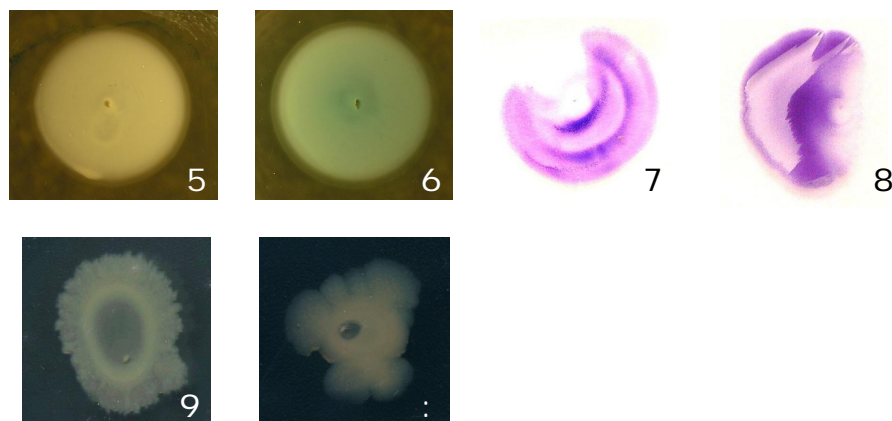
#### *Swarming motility test*

*Swarming* motilita byla testována na *swarming* médiu (Deligianni a kol. 2010). Bakterie byly inokulovány kolmým dotykem bakteriologické jehly na povrch média. Zóna pohybu byla odečítána po 48hodinové kultivaci při 37 °C (obr. 7 – E, F). Misky byly skenovány a k odečtu *swarming* motility byl použit software ImageJ (Rasband 2011).

### 3.2.3 Průkaz tvorby biofilmu

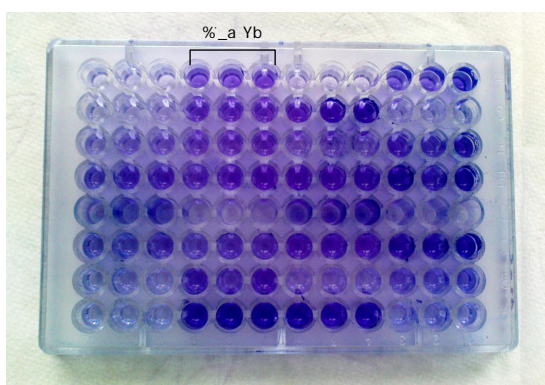
#### Průkaz tvorby submerzního biofilmu

Tvorba submerzního biofilmu byla testována modifikovanou Christensenovou metodou v mikrotitrační destičce (Stepanović a kol. 2000). Do jednotlivých důlků bylo napipetováno

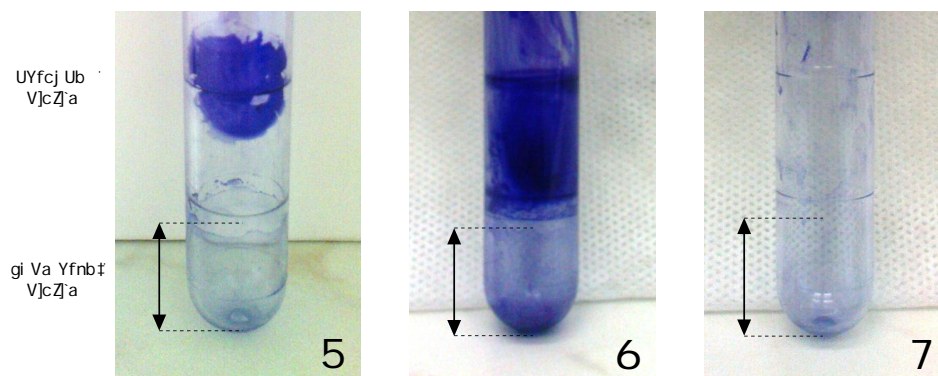


**Obrázek 7:** Různé typy pohybu *P. aeruginosa* (foto Olejníčková), stav při odečtu zóny. A,B – *swimming* motilita (odečet zóny na agaru), C,D – *twitching* motilita (odečet zóny na dně misky po obarvení krystalovou violetí), E,F – *swarming* motilita (odečet zóny na agaru).

180  $\mu$ l mozkosrdcové infúze se 4% glukózy (BHIg) a 20  $\mu$ l bakteriální suspenze v BHIg o zákalu 1 dle McFarlandovy stupnice. Destičky byly kultivovány 24 hodin při teplotě 37°C, třikrát propláchnuty vodou a fixovány sušením. Biofilm narostlý na stěnách důlků byl barven 15 minut krystalovou violetí, neadherované barvivo bylo vypláchnuto vodou a destičky byly usušeny. Navázaná krystalová violet byla rozpuštěna v 150  $\mu$ l etanolu a kvantifikována spektrofotometricky při 595 nm (obrázek 8). Všechny kmeny byly testovány ve třech opakováních.



**Obrázek 8:** Testování submerzního typu biofilmu v mikrotitrační destičce (foto Olejníčková), stav po obarvení krystalovou violetí a rozpuštění barviva v etanolu.



**Obrázek 9:** Kvantifikace aerovaného biofilmu (foto Olejníčková), stav po obarvení krystalovou violetí. A, B – producenti aerovaného biofilmu, C – kmen neprodukcující aerovaný biofilm.

### Průkaz tvorby aerovaného biofilmu

Aerovaný biofilm se tvořil na rozhraní vzduchu a kultivačního média v podobě blanky s různou morfológií. Produkce aerovaného biofilmu byla testována v polystyrenových zkumavkách. Médium a kultivační podmínky byly shodné s metodikou dle Stepanoviče a kol. (2000) uvedenou v předchozím odstavci. Do zkumavky bylo napipetováno 1,8 ml média a 200  $\mu\text{l}$  mikrobiální suspenze o zákalu 1 dle McFarlandovy stupnice. Po kultivaci byla odečtena přítomnost blanky na povrchu média, její charakter a aerovaný biofilm byl následně u části kmenů kvantifikován. Vzhledem k náročnosti zpracování byla tvorba aerovaného biofilmu kvantifikována pouze u části kmenů. Blanka byla opatrným pohybem zkumavky přichycena ke stěně, zkumavka byla třikrát propláchnuta vodou a blanka byla fixována sušením. Celá zkumavka byla po dobu 15 minut barvena krystalovou violetí, přebytek barviva byl odstraněn několikerým promytím vodou. Barvivo navázané na submerzním biofilmu bylo rozpuštěno v 1,5 ml etanolu a odpipetováno. Krystalová violet navázaná na aerovaný biofilm byla rozpuštěna v 660  $\mu\text{l}$  etanolu a množství barviva bylo kvantifikováno při 595 nm. Kmeny byly testovány ve třech opakováních.

### 3.2.4 Produkce extracelulárních látek

#### Průkaz tvorby hemolyzinů

Tvorba obou typů hemolyzinů produkovaných *P. aeruginosa* byla testována kultivací na krevním agaru (Silva a kol. 2008). Výsledek byl odečten po 24hodinové kultivaci při 37 °C.

Tvorba hemolyzinů se projevila projasněním média v okolí nárůstu.

Pro kvantifikaci produkce hemolyzinů byla použita metodika dle Rampioni a kol. (2009). Bakterie byly kultivovány 18 hodin při 37 °C v LB bujónu, vortexovány po dobu 15 s a optická denzita suspenze byla pomocí sterilního LB bujónu upravena na 3 stupně dle McFarlandovy zákalové stupnice. Suspenze 1 ml buněk byla smíchána s 50  $\mu$ l roztoku propraných erytrocytů. Jako negativní kontrola byl použit 1 ml LB bujónu s 50  $\mu$ l propraných erytrocytů. Směs byla inkubována při 37 °C po dobu tří hodin. Nezlyzované erytrocyty a zbytky buněk byly odstraněny centrifugací (20 minut, 11 000 rpm, pokojová teplota) a optická denzita supernatantu byla změřena při 545 nm. Aktivita hemolyzinů je přímo úměrná množství hemoglobinu uvolněného z erytrocytů po kultivaci s bakteriální suspenzí. Jako hemolyziny-produkující kmeny byly vyhodnoceny izoláty, jejichž OD<sub>545</sub> supernatantu byla vyšší než průměrná OD<sub>545</sub> negativních kontrol.

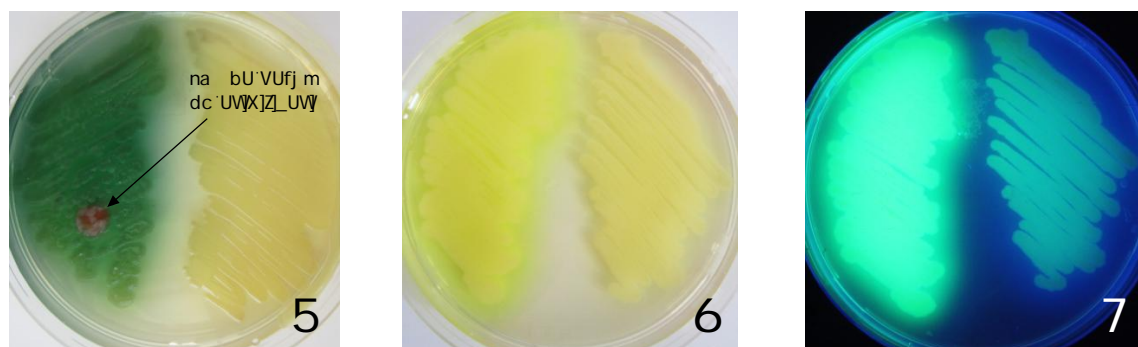
### **Průkaz tvorby LasB elastázy**

Produkce LasB elastázy byla sledována pomocí elastinového testu s kongo červení (Hamood a kol. 1996). Bakterie byly kultivovány 18 hodin při 37 °C v LB bujónu, vortexovány po dobu 15 s a optická denzita suspenze byla pomocí sterilního LB bujónu upravena na 3 stupně dle McFarlandovy zákalové stupnice. 700  $\mu$ l suspenze bylo smícháno s 250  $\mu$ l roztoku kongo červení konjugované s elastinem v Tris pufru (100 mmol/l) s 1 mol/l CaCl<sub>2</sub>. Negativní kontrolu tvořilo 700  $\mu$ l LB bujónu s 250  $\mu$ l kongo červení konjugované s elastinem. Buňky byly inkubovány při 37 °C po dobu 17 hodin. Elastáza rozložila konjugát, buňky byly zcentrifugovány (20 minut, 11 000 rpm, pokojová teplota) a množství uvolněné kongo červeně bylo změřeno spektrofotometricky (OD<sub>492</sub>). Jako LasB elastázu-produkující byly vyhodnoceny izoláty, jejichž OD<sub>492</sub> byla vyšší než průměr OD<sub>492</sub> negativních kontrol.

### **Průkaz tvorby pigmentů**

Tvorba pigmentů – pyocyaninu, pyoverdinu a pyochelinu – byla detekována kultivací kmenů na speciálních půdách (Fonseca a kol. 2008). Pseudomonádový agar P (King A agar) pro detekci pyocyaninu a pyochelinu je jednoduché médium chudé na fosfáty. Pseudomonádový agar F (King B agar) je médium s dostatkem fosfátů vhodné pro detekci pyoverdinů. Kmeny byly očkované bakteriologickou kličkou a kultivovány 24 hodin při 37 °C. Produkce solubilních pigmentů se projevila změnou barvy média v okolí kmene (viz obrázek 10). Sekrece pyocyaninu byla potvrzena změnou barvy po acidifikaci 1 mol/l kys. chlorovodíkovou (Bachofen a Siegrist 2008).





**Obrázek 10:** Produkce solubilních pigmentů *P. aeruginosa* (foto Olejníčková). A vlevo – zelenomodrý pigment pyocyanin (včetně zčervenání po okyselení 1mol/l kys. chlorovodíkovou, B, C vlevo – zelenožlutý pigment pyoverdin (C vlevo – fluorescence pigmentu pod UV lampou – při 312 nm).

### 3.2.5 Testování citlivosti k antibiotikům

Citlivost k antibiotikům byla testována pomocí standardního diskového difuzního testu (Urbášková 1998). Byla použita sestava 13 disků s antibiotiky používanými při léčbě pseudomonádových infekcí (množství antibiotika v jednotlivých discích je uvedeno v kapitole 3.1.3). Bakterie narostlé na MH agaru byly suspendovány v 3 ml sterilního fyziologického roztoku tak, aby zákal odpovídal 0,5 stupně McFarlandovy stupnice (densita buněk asi  $1,5 \cdot 10^8$  CFU/ml). Inokulum bylo očkováno roztěrem sterilním vatovým tampónem na předsušené MH plotny (pro každý kmen dvě). Po zaschnutí inokula (5 – 10 minut) byly na ploty umístěny antibiotické disky pomocí dispensoru. Po 20hodinové kultivaci při 37 °C byly změřeny inhibiční zóny a velikost zóny byla porovnána s referenčními hodnotami uvedenými v tabulce 3. Mikrob byl k danému antibiotiku citlivý, pokud velikost inhibiční zóny byla větší než velikost referenční zóny. Jako kontrola kvality byly použity kmeny *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3996 a *Escherichia coli* CCM 3954.

#### Detekce $\beta$ -laktamáz

Pseudomonády produkují několik typů  $\beta$ -laktamáz s různou substrátovou specifitou (Liptáková a kol. 2005). Sekrece  $\beta$ -laktamáz širokého spektra (ESBL) a  $\beta$ -laktamázy typu AmpC byla testována u kmenů rezistentních k cefalosporinům III. generace – ceftazidimu a cefoperazonu (Hrabák a kol. 2009), celkem u 47 kmenů. Metallo- $\beta$ -laktamázy (MBL) byly sledovány u celkem 58 kmenů necitlivých k alespoň jednomu z karbapenemů – imipenemu a/nebo meropenemu (Hrabák a kol. 2007). U 35 kmenů byly testovány všechny typy  $\beta$ -laktamáz. Test na produkci  $\beta$ -laktamáz byl proveden pomocí *double disk synergy testu* dle

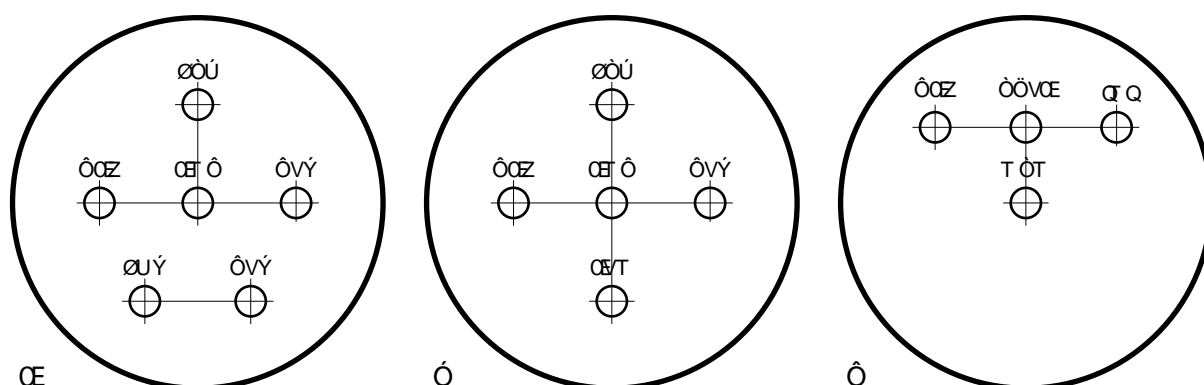
Tabulka 3: Antibiotika testovaná v rámci diskového difuzního testu.

Antibiotikum	Skupina	Množství antibiotika v disku [ $\mu\text{g}$ ]	Hraniční průměr inhibiční zóny [mm]
amikacin	aminoglykosidy	30	17
aztreonam	monobaktamy	30	22
cefepim	cefalosporiny IV. generace	30	18
cefoperazon	cefalosporiny III. generace	75	21
cefoperazon/sulbaktam	cefalosporiny III. generace/ inhibitor- $\beta$ -laktamáz	75 + 30	21
ceftazidim	cefalosporiny III. generace	30	18
ciprofloxacín	fluorochinolony	5	21
gentamicin	aminoglykosidy	10	15
imipenem	karbapenemy	10	16
kolistin	polypeptidy	10	10
meropenem	karbapenemy	10	16
ofloxacin	fluorochinolony	5	16
piperacilin/tazobaktam	acylaminopeniciliny/ inhibitor $\beta$ -laktamáz	100 + 10	18

Hrabáka a kol. (2009). Bakterie byly suspendovány v 3 ml sterilního fyziologického roztoku tak, aby zákal odpovídal 0,5 stupně McFarlandovy stupnice. Roztok byl dále stokrát ředěn (konečná denzita buněk asi  $10^6$  CFU/ml). Inokulem byly přelity plotny a přebytek tekutiny byl odpipetován. Pro průkaz ESBL a MBL byl použit MH agar, pro detekci AmpC pak MH agar a MH agar s oxacilínem. Po zaschnutí inokula byly na plotny aplikovány antibiotické disky podle schématu uvedeného na obrázku 11 (vzdálenost středů disků cca 20 mm). Na prázdný středový disk pro detekci MBL bylo aplikováno 10  $\mu\text{l}$  EDTA a disk se nechal volně zaschnout. Plotny byly kultivovány 24 hod při 37 °C. Pozitivní výsledek byl odečten v případě charakteristické deformace inhibičních zón:

- pro průkaz ESBL – rozšíření inhibiční zóny směrem k disku s inhibitorem (ampicilin - kys. klavulanová),
- pro průkaz inducibilní AmpC – deformace inhibiční zóny do tvaru písmena D u disku s cefalosporiny třetí generace směrem k disku s induktorem (kys. klavulanovou, cefoxitinem),
- pro průkaz konstitutivní AmpC – rozdíl velikostí inhibičních zón mezi plotnami s MH a MH s oxacilínem,
- pro průkaz MBL – rozšíření zóny směrem k disku s inhibitorem (EDTA).

Deformace zón typická pro jednotlivé typy  $\beta$ -laktamáz je patrná na obrázku 12.



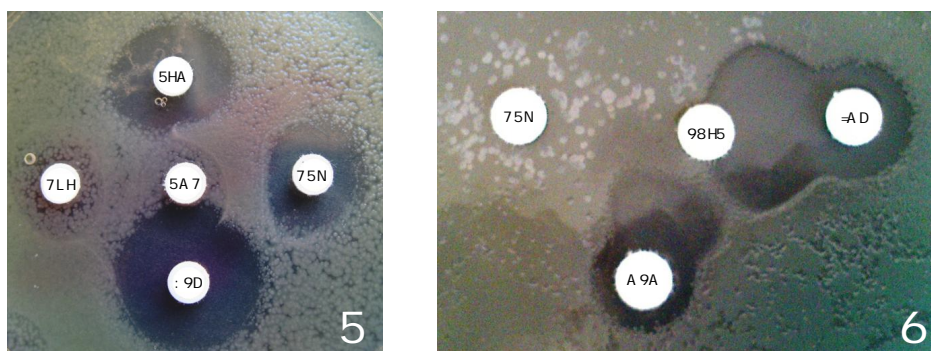
**Obrázek 11:** Rozložení disku pro detekci ESBL, AmpC a MBL. A – MH agar (detekce ESBL), B – MH agar s oxacilínem (detekce AmpC), C – MH agar (detekce MBL), převzato z Hrabák a kol. (2009), upraveno. Legenda viz seznam zkratk.

### Konfirmační test produkce MBL

Sekrece MBL byla potvrzena spektrofotometrickým testem hydrolýzy imipenemu, který byl proveden na mikrobiologickém ústavu FN Plzeň. U producenta MBL dochází k poklesu absorbance roztoku imipenemu (OD 299 nm) vlivem degradace antibiotika (Hrabák a kol. 2007).

### 3.2.6 Testování účinnosti antibiotických zátek

Technika antibiotické zátky umožňuje eradikaci mikrobiálního ložiska z lumen katétru (Mermel a kol. 2009). Účinek antibiotické zátky byl testován u 12 biofilm-tvořících fenotypově odlišných kmenů (pohyblivé vs. nepohyblivé kmeny, rezistentní vs. citlivé kmeny) s využitím ciprofloxacinu, amikacinu a etanolu (i spolu s citrátem sodným) jako antimikrobního agens. Citlivost/rezistence a pohyblivost jakožto určující charakteristika kmene byly vybrány jako pro svůj význam při rozvoji katérových infekcí. Každá fenotypová kombinace byla testována ve třech opakováních (viz tabulka 4). Všechny kmeny tvořily biofilm jako silní nebo minimálně středně silní producenti. Jako citlivé k antibiotikům byly hodnoceny kmeny citlivé nejméně k 11 antibiotikům ze 13 testovaných (1 kmen byl rezistentní k ofloxacinu a 1 kmen byl rezistentní k ofloxacinu a ciprofloxacinu). Všechny rezistentní kmeny vykazovaly citlivost pouze k amikacinu a kolistinu. Jeden kmen byl dále



**Obrázek 12:** Detekce  $\beta$ -laktamáz (foto Olejníčková): A – AmpC  $\beta$ -laktamáza projevující se deformací inhibiční zóny ve tvaru písmena D u disku s ceftazidimem směrem k disku s amoxicilinem/kys. klavulanovou, B – produkce MBL detekovaná jako rozšíření inhibičních zón imipenemu a meropenemu směrem k disku s EDTA. Použité zkratky jsou uvedeny v seznamu zkratk.

citlivý k aztreonamu a jeden kmen vykazovat intermediární rezistenci k cefepimu a ceftazidimu. Většina rezistentních kmenů produkovala AmpC  $\beta$ -laktamázu. Jako pohyblivé kmeny byly vybrány ty, jejichž *swimming* motilita byla větší než 230 mm<sup>2</sup>. Nepohyblivé kmeny vytvářely zónu *swimming* motility menší než 65 cm<sup>2</sup>. Účinnost antibiotické zátky byla zjišťována v mikrotitrační destičce. U všech kmenů byly zjištěny hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC).

### Stanovení MIC a MBC

Ke kvantitativnímu hodnocení citlivosti mikroba k antibiotiku lze využít odečet MIC a MBC. Hodnoty MIC a MBC pro amikacin a ciprofloxacin byly stanoveny u pomocí mikrodiluční bujónové metody dle NCCLS (2003). Test byl prováděn v mikrotitračních destičkách, které obsahovaly 100  $\mu$ l MH bujónu a příslušnou koncentraci antibiotika (0,125–4096 mg/l amikacinu nebo 0,063–2048 mg/l ciprofloxacinu). Standardní inokulum (suspenze ve sterilním fyziologickém roztoku o denzitě 0,5 dle McFarlandovy stupnice) bylo inokulováno pomocí replikátoru. Destičky byly inkubovány 20 hodin při 37 °C. Hodnota MIC byla odečtena jako koncentrace antibiotika v prvním dílku bez viditelného zákalu. Jako kontrola kvality byly použity kmeny *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3996 a *Escherichia coli* CCM 3954. Následně byla zjištěna hodnota MBC. Po přidání redoxního indikátoru (10  $\mu$ l 0,02% roztoku resazurinu, sterilizován fitrací) a inkubaci 24 hodin při 37 °C byla odečtena hodnota MBC jako koncentrace antibiotika v prvním dílku s buňkami bez metabolické aktivity (bez změny barvy indikátoru) (Pettit a kol. 2005, Růžička a Holá 2008). Kmeny byly testovány ve třech opakováních.

**Tabulka 4:** Fenotypová charakteristika kmenů použitých pro testování účinnosti antibiotické zátky.

Kmen	Charakteristika		
29GB 33KA 52NC	biofilm-pozitivní	rezistentní	pohyblivý
64AC 81AD 96BC	biofilm-pozitivní	rezistentní	nepohyblivý
65MB 01TB 37SB	biofilm-pozitivní	citlivý	pohyblivý
33RC 88EB 67JB	biofilm-pozitivní	citlivý	nepohyblivý

### Testování účinnosti antibiotické zátky

Účinek antibiotické zátky byl testován na jednodenním biofilmu. Byly testovány roztoky etanolu (70% etanol, 30% etanol a 30% etanol suplementovaný 4% citrátu sodného), amikacinu (4; 2; 1; 0,5 mg/ml) a ciprofloxacinu (1; 0,5; 0,2 mg/ml) (Lee a kol. 2007, Opilla a kol. 2007). Postup přípravy biofilmu v mikrotitrační destičce je popsán v kapitole 3.2.3. Po 24hodinové kultivaci při 37 °C byly důlky třikrát propláchnuty 200  $\mu$ l pufrovaného fyziologického roztoku (PBS) a byl napipetován roztok antibiotické zátky (200  $\mu$ l). Následovala další 24hodinová kultivace při 37 °C a další propláchnutí 200  $\mu$ l PBS. Nakonec bylo do důlků napipetováno 200  $\mu$ l MH bujónu s 10  $\mu$ l 0,02% resazurinu. Po 24hodinové kultivaci byl odečten výsledek testu. Účinná koncentrace antimikrobiálního agens byla odečtena z prvního důlku s buňkami bez metabolické aktivity (bez změny barvy indikátoru). Každý kmen byl testován ve třech opakováních.

### 3.2.7 Statistické vyhodnocení

Data byla vyhodnocena za použití programu Statistica for Windows 9.1 (StatSoft 2011) pomocí korelačního koeficientu gama a párového t-testu. Hladina významnosti všech korelačních testů byla stanovena jako  $p=0,05$ . Za významné byly považovány korelační koeficienty s  $p > 0,05$  a korelací vyšší než 40 % (tj.  $\gamma > 0,40$ ).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Charakteristika souboru

Kmeny zpracované v rámci diplomové práce pocházely z různých oddělení 4 zdravotnických zařízení v Brně (viz tabulka 5). Nejčastěji zastoupenými odděleními byla Oddělení 13 CKTCH (43 izolátů, 24,6 %) a I. neurologická klinika FNUSA (36 izolátů, 20,6 %), které dohromady představovaly téměř polovinu všech izolátů. V souboru bylo 68 žen a 107 mužů. Průměrný věk pacientů byl 74 let (23–99 let) (viz tabulka 6). Všechny údaje o testovaných kmenech jsou uvedeny v příloze A.1.

**Tabulka 5:** Zdravotnická zařízení a oddělení, ze kterých pocházely testované izoláty (celkem 175 kmenů).  
Legenda viz seznam zkratk.

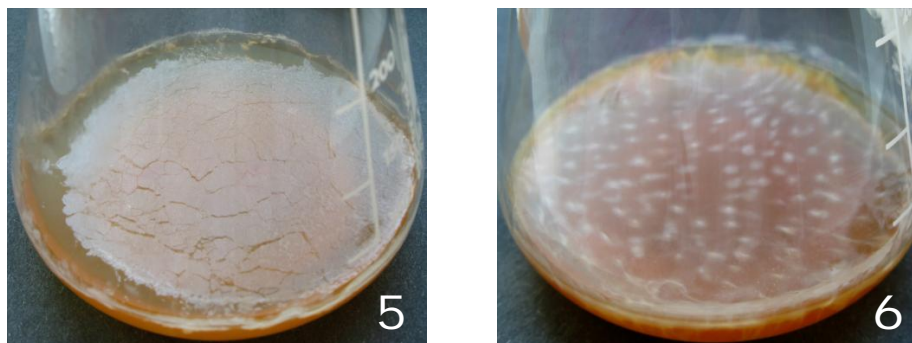
Pracoviště	Oddělení	Celkem	%	Močový katétr	%	Krevní katétr	%
FNUSA	ARK	14	8,0	8	4,6	6	3,4
	I. NK	36	20,6	35	20,0	1	0,6
	I. CHK	12	6,9	8	4,6	4	2,3
	II. CHK	14	8,0	14	8,0	0	0,0
	I. IKK	8	4,6	7	4,0	1	0,6
	II. IK	5	2,9	1	0,6	4	2,3
	NCHK	9	5,1	6	3,4	3	1,7
	ORL	1	0,6	0	0,0	1	0,6
	<b>celkem</b>	99	56,6	79	45,1	17	9,7
CKTCH	Odd. 10	5	2,9	4	2,3	1	0,6
	Odd. 13	3	24,6	36	20,6	7	4,0
	Odd. 12	3	1,7	1	0,6	0	0,0
	Odd. 14	1	0,6	1	0,6	0	0,0
	KCH	1	0,6	1	0,6	0	0,0
	<b>celkem</b>	53	30,3	43	25	10	6
MOÚ	JIP	10	5,7	6	3,4	4	2,3
	KKOP	4	2,3	3	1,7	1	0,6
	G	1	0,6	1	0,6	0	0,0
	U	1	0,6	0	0,0	1	0,6
	I	1	0,6	1	0,6	0	0,0
	<b>celkem</b>	17	9,7	11	6,3	6	3,4
NMB	I	6	3,4	6	3,4	0	0,0
	<b>celkem</b>	6	3,4	6	3,4	0	0,0

Tabulka 6: Věková struktura pacientů, od kterých pocházely testované izoláty.

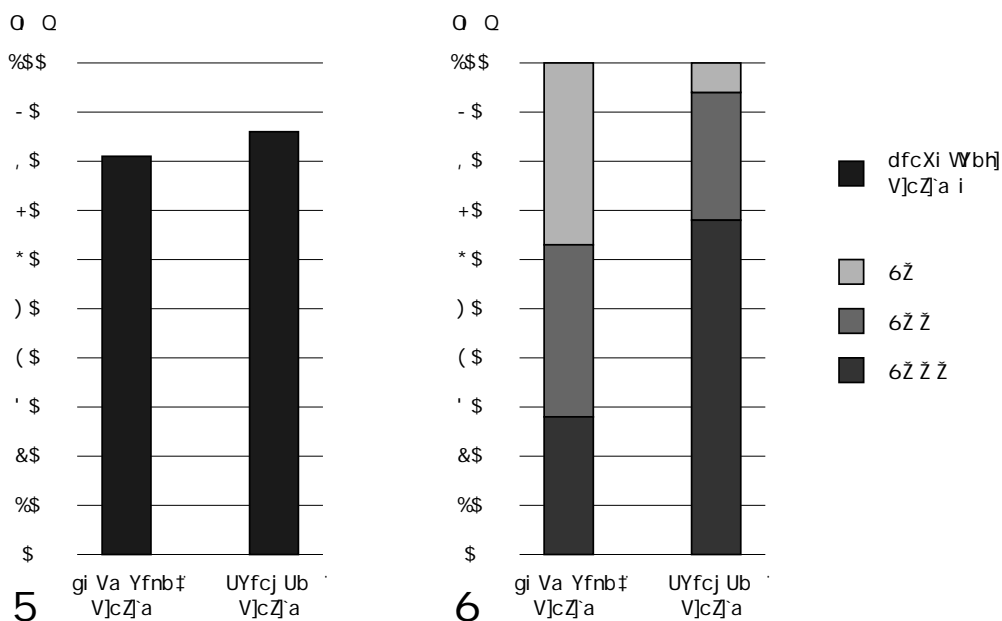
Věk	Muži		Ženy		Celkem	%
	Σ	%	Σ	%		
20–39	5	2,9	2	1,1	7	4,0
40–59	11	6,3	4	2,3	15	8,6
60–79	62	35,4	27	15,4	89	50,9
80 a více	29	16,6	35	20,0	64	36,6
<b>celkem</b>	<b>107</b>	<b>61,1</b>	<b>68</b>	<b>38,9</b>	<b>175</b>	<b>100,0</b>

## 4.2 Průkaz tvorby biofilmu

Tvorba submerzního biofilmu byla zkoumána v mikrotitrační destičce (obrázek 8). K vyhodnocení množství produkovaného biofilmu byla použita metodika dle Stepanoviće a kol. (2000) za využití výpočtu:  $množství\ biofilmu = OD - OD_c$ . K průměru absorbancí negativní kontroly byla připočtena třikrát směrodatná odchylka a součet ( $OD_c$ ) byl odečten od průměru absorbancí vzorku. Následně byly izoláty rozděleny do 4 skupin – kmeny neprodukující biofilm ( $OD \leq OD_c$ ) slabí producenti biofilmu ( $OD_c \leq OD \leq 2 \cdot OD_c$ ), středně silní producenti biofilmu ( $2 \cdot OD_c \leq OD \leq 4 \cdot OD_c$ ) a silní producenti biofilmu ( $4 \cdot OD_c \geq OD$ ). Z testovaných izolátů byla necelá třetina – 40 izolátů (22,9 %) vyhodnocena jako silní producenti biofilmu, 49 kmenů (28,0 %) bylo středně silnými producenty a 52 kmenů (29,7 %) slabými producenty biofilmu (viz obrázek 14). U 34 kmenů (19,4 %) nebyla prokázána produkce biofilmu v mikrotitrační destičce.



Obrázek 13: Aerovaný biofilm (foto Olejníčková), A – kompaktní typ, B – vločkovitý typ.



**Obrázek 14:** A – porovnání počtu kmenů, které tvořily jednotlivé typy biofilmu, B – rozdělení podle síly produkce.

Aerovaný biofilm (biofilm na rozhraní kapaliny a vzduchu) byl oproti submerznímu biofilmu testován v polystyrenových zkumavkách. Většina izolátů (149 testovaných kmenů, 85,1 %) tvořila vrstvu aerovaného biofilmu, přičemž 32 kmenů (18,3 %) tvořilo silnější hmotu aerovaného biofilmu. Pouze u 26 kmenů (14,9 %) nebyla blanka na rozhraní fází patrná. Kmeny produkující aerovaný biofilm byly rozděleny do 3 skupin dle Koza a kol. (2009), jejichž charakteristika je uvedena v tabulce 7. Nejčastěji (105 kmenů, 60,0 % z celkového počtu kmenů) kmeny tvořily kompaktní typ aerovaného biofilmu – robustní homogenní hmotu s větší tloušťkou a dobrou soudržností (viz obrázek 13 A). U 24 kmenů (13,7 %) byla detekována tvorba vizkózní formy aerovaného biofilmu, která je podobná kompaktnímu typu, pouze se vyznačuje menší soudržností (je nejvíce fragilním typem aerovaného biofilmu). Na rozdíl od kompaktního biofilmu vizkózní typ nedrží tvar při nahnutí zkumavky a volně se přelévá ve směru toku kapaliny jako vrstva vizkózní kapaliny. Při vortexování se zcela zničí struktura hmoty a nezůstanou žádné viditelné shluky. Adheze na stěny zkumavky je slabší než je tomu u kompaktního typu. Posledním detekovaným typem byl vločkovitý biofilm pozorovaný u 20 kmenů (11,4 %). Vločkovitý biofilm tvoří jednotlivé shluky koncentrované hmoty obklopené řídkou substancí (viz obrázek 13 B). Po nahnutí zkumavky není biofilm soudržný a přelévá se ve směru toku kapaliny. U 96 izolátů tvořících aerovaný biofilm bylo množství biofilmu kvantifikováno spektrofo-



tometricky, hodnocení dle metodiky Stepanoviće a kol. (2000) – 65 kmenů (67,7 % z testovaných izolátů) bylo silnými producenty biofilmu a 25 kmenů (26,0 %) středně silnými producenty biofilmu, 6 kmenů (6,3 %) bylo vyhodnoceno jako slabí producenti aerovaného biofilmu (viz obrázek 14).

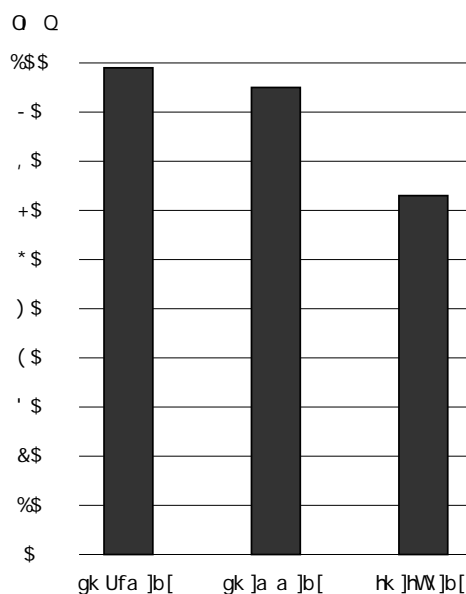
**Tabulka 7:** Charakteristika jednotlivých kategorií aerovaného biofilmu a počty kmenů, které vytvářely daný typ biofilmu (celkem 149 kmenů), převzato z Koza a kol. (2009), upraveno.

	Kategorie aerovaného biofilmu		
	kompaktní	vločkovitý	vizkózní
počet kmenů	105	20	24
charakteristika	jednolitá hmota, kompaktní a soudržná	jednotlivé shluky obklopené řídkou hmotou	méně kompaktní hmota s menší tloušťkou
soudržnost	dobrá	rozpadá se na jednotlivé shluky	slabá
přilnavost a růst na stěnách zkumavky	dobrá	slabší	slabá

### 4.3 Průkaz pohyblivosti kmenů

Velikost zóny vzniklá na speciálním médiu je přímo úměrná motilitě kmene. Vzhled kolonií narostlých na jednotlivých médiích je patrný na obrázku 7 A–E. Výsledky testů pohyblivosti jsou uvedeny na obrázcích 15 a 16. Jako nepohyblivé byly u všech testů pohyblivosti hodnoceny kmeny, které spíše než zónu růstu vytvořily pouze kolonii s plochou menší než 20 mm<sup>2</sup>.

Téměř všechny kmeny vykazovaly *swimming* motilitu, po inkubaci tvořily izoláty pravidelné kruhové zóny. Plocha největší zóny byla 5150,4 mm<sup>2</sup> (kmen přeplaval prakticky celou misku), nejmenší zóna měřila 28,2 mm<sup>2</sup>. Devět kmenů (5,1 %) bylo hodnoceno jako nepohyblivé izoláty (zóna < 20 mm<sup>2</sup>). Při *twitching* a *swarming* motilitě vznikaly převážně nepravidelné útvary. Při testování *twitching* motility byla čtvrtina kmenů (celkem 48 – 27,4 %) nepohyblivá (zóna < 20 mm<sup>2</sup>). Nejvíce pohyblivý kmen *twitching* motilitou vytvořil zónu o velikosti 1817,5 mm<sup>2</sup>, minimální plocha měla obsah 21,0 mm<sup>2</sup>. Všechny kmeny až na jeden byly pohyblivé pomocí *swarming* motility. Vzniklé zóny byly v rozmezí



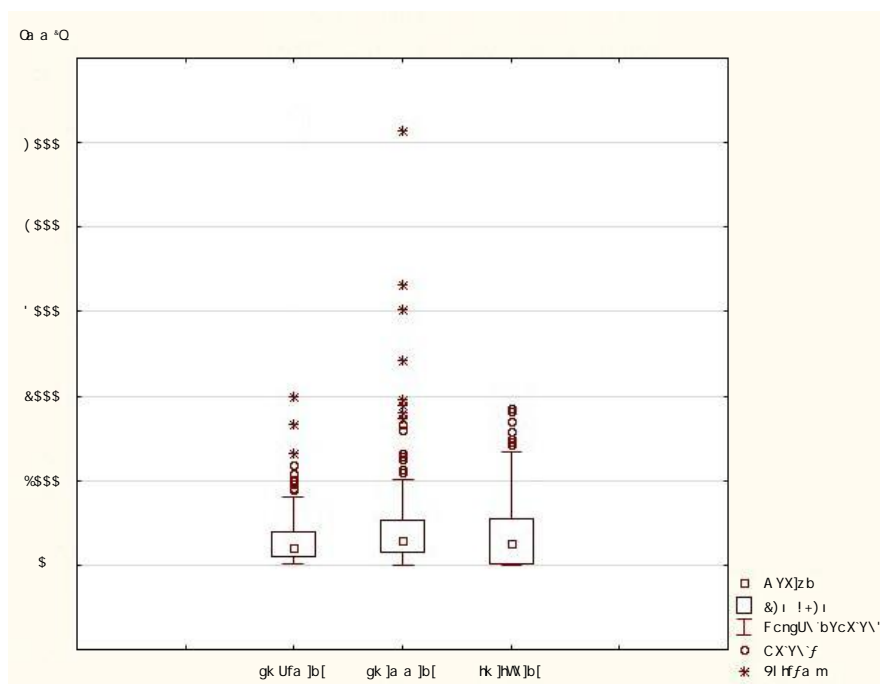
**Obrázek 15:** Procentuální porovnání počtu kmenů, které byly schopny jednotlivých typů pohybu.

22,0 – 2000,5 mm<sup>2</sup>. Mezi zkoumanými kmeny nebyl detekován žádný zcela nepohyblivý izolát. Celkem 120 kmenů bylo pohyblivých všemi testovanými typy motility. Dva kmeny vykazovaly pouze *swarming* motilitu, jeden kmen byl pohyblivý pouze pomocí *swimming*. Dalších 52 kmenů bylo schopno pohybovat se pomocí dvou typů pohybů. Pouze kombinací *swarming* a *swimming* motility vykazovalo 45 kmenů, 7 kmenů bylo pohyblivých jen pomocí *swarming* a *twitching* motility.

## 4.4 Sekretované látky

### 4.4.1 Hemolyziny

Produkce hemolyzinů byla hodnocena po kultivaci na krevním agaru a kvantitativně pomocí spektrofotometrického testu. V testovaném souboru 173 kmenů (98,9 %) tvořilo hemolyziny jak na krevním agaru tak při spektrofotometrickém stanovení (viz obrázek 17). Celkem 103 kmenů tvořilo na krevním agaru zónu úplné hemolýzy, 70 kmenů pak zónu neúplné hemolýzy, přičemž 3 kmeny tvořily zónu hemolýzy pouze pod koloniemi. Pouze u 2 kmenů nebyla produkce hemolyzinů detekována ani na krevním agaru ani při spektrofotometrickém stanovení.



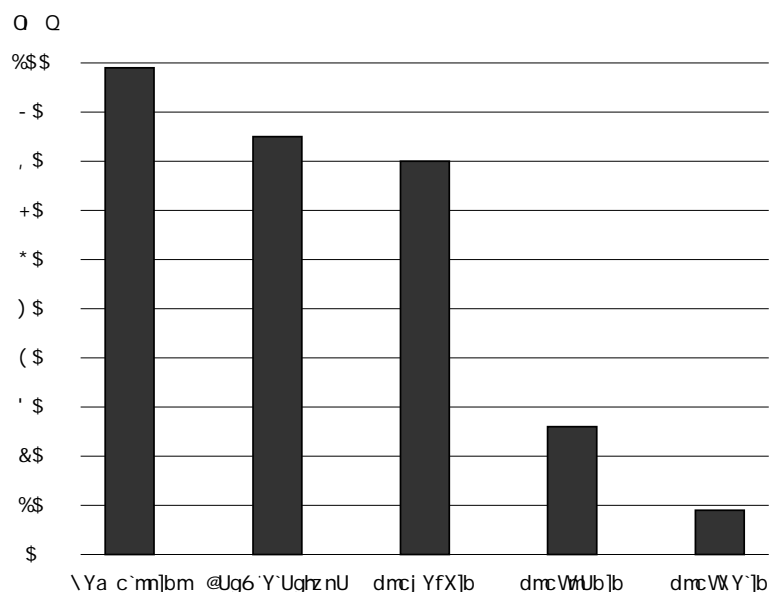
**Obrázek 16:** Krabicové grafy udávající rozptyl hodnot u jednotlivých typů motility. Mediány hodnot jsou přibližně stejné (*swimming* – 268,9 mm<sup>2</sup>, *twitching* – 248,6 mm<sup>2</sup> a *swarming* – 209,4 mm<sup>2</sup>), *swimming* motilita však vykazuje větší rozptyl hodnot.

#### 4.4.2 LasB elastáza

Produkce proteolytického enzymu byla sledována spektrofotometrickým testem. Z testovaného souboru 150 kmenů (85,7 %) tvořilo LasB elastázu (viz obrázek 17). Zbytek (25 kmenů, 14,3 %) byl vyhodnocen negativně.

#### 4.4.3 Tvorba pigmentů

Tvorba pigmentů byla testována kultivací izolátů na speciálních médiích a odečtena jako změna barvy média v okolí nárůstu. Nejvíce – 139 kmenů (79,4 %) tvořilo zelenožlutý fluoreskující pigment pyoverdin (viz obrázek 10 B, C), 45 kmenů (25,7 %) produkovalo zelenomodrý pyocyanin (viz obrázek 10 A) a 15 kmenů (8,6 %) nahnědlý pyochelin. Produkce pigmentů je souhrnně zobrazena na obrázku 17.



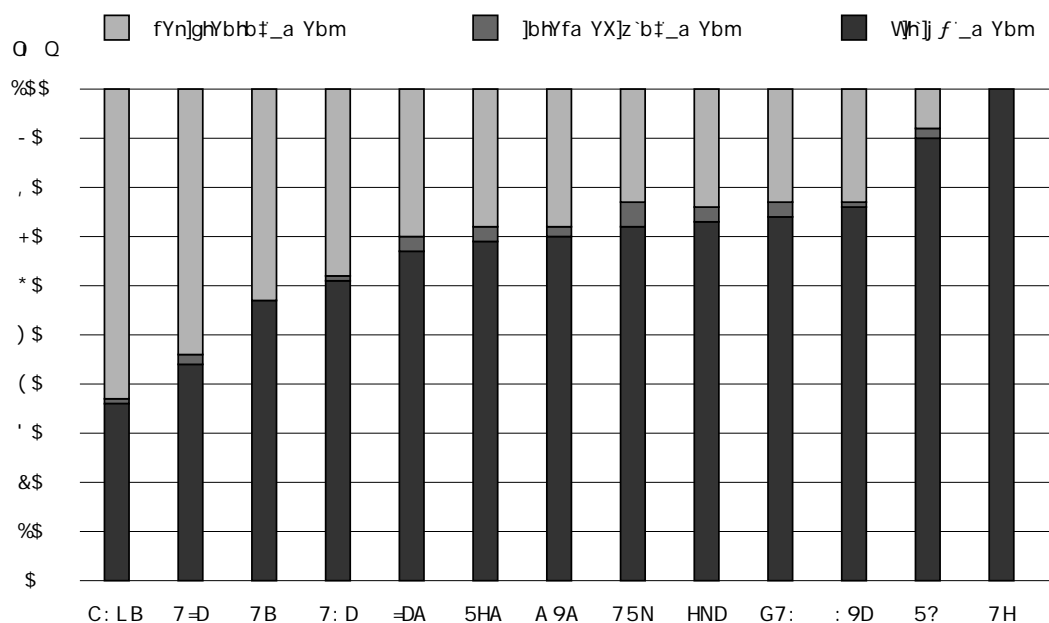
**Obrázek 17:** Procentuální porovnání počtu kmenů, které produkovaly testované faktory virulence.

## 4.5 Citlivost k antibiotikům

Citlivost izolátů k jednotlivým antibiotikům byla zjišťována pomocí diskového difuzního testu. Účinnost antibiotik je shrnuta na obrázku 18. Ze 13 testovaných antibiotik vykazoval největší účinek kolistin, ke kterému byly citlivé všechny kmeny. Amikacin byl účinný u 157 (89,7 %) kmenů, cefepim u 132 (75,4 %), cefoperazon/sulbaktam u 129 (73,7 %), piperacilin/tazobaktam u 128 (73,1 %), ceftazidim u 125 (71,4 %), meropenem u 123 (70,3 %), aztreonam u 121 (69,1 %), imipenem u 118 (67,4 %), cefoperazon u 106 (60,6 %), gentamicin u 100 (57,1 %) a ciprofloxacin u 76 (43,4 %) kmenů. Pouze u třetiny kmenů (63 kmenů, 36,0 %) byla zachována citlivost k ofloxacinu.

### 4.5.1 Detekce $\beta$ -laktamázy

Produkce ESBL a  $\beta$ -laktamázy typu AmpC byla sledována u 47 kmenů necitlivých k ceftazidimu a cefepimu. Žádný kmen neprodukoval ESBL ani konstitutivní AmpC, inducibilní AmpC byla prokázána u 31 kmenů (83,8 % z testovaných kmenů, 17,7 % z celkového počtu kmenů). MBL byly testovány u 58 izolátů, které byly rezistentní k imipenemu a/nebo meropenemu. Charakteristická deformace zóny byla patrná u 7 kmenů (12,1 % z testovaných kmenů, 4,0 % z celkového počtu kmenů). Konfirmační test potvrdil produkce MBL u 2 kmenů (28,6 % z testovaných kmenů, 1,1 % z celkového počtu kmenů).



Obrázek 18: Výsledky testování citlivosti izolátů. Legenda viz seznam zkratk.

## 4.6 Korelace mezi faktory virulence

Pozitivní korelace byla detekována mezi produkcí některých extracelulárních látek – pyochelinem a pyocyaninem u močových ( $p \ll 0,0001$ ;  $\gamma = 0,7112$ ) i cévních katétrů ( $p = 0,0005$ ;  $\gamma = 1$ ), pyochelinem a LasB elastázou u močových katétrů ( $p = 0,0185$ ;  $\gamma = 1$ ) a mezi produkcí pyoverdinů a hemolyzinů u cévních katétrů ( $p = 0,0045$ ;  $\gamma = 1$ ). Celkově (bez rozlišení močových a cévních katétrů) pak byla zjištěna pozitivní korelace mezi pyochelinem a pyocyaninem ( $p \ll 0,0001$ ;  $\gamma = 0,7792$ ), pyochelinem a LasB elastázou ( $p = 0,0161$ ;  $\gamma = 1,0000$ ) a pyoverdiny a hemolyziny ( $p = 0,0032$ ;  $\gamma = 0,7792$ ). Mezi produkcí extracelulárních látek nebyla zaznamenána žádná negativní korelace.

Sekrece hemolyzinů (bez rozlišení močových a cévních katétrů) korelovala pozitivně s *twitching* motilitou ( $p = 0,0460$ ;  $\gamma = 0,55166$ ) a negativně s *swimming* motilitou ( $p = 0,0240$ ;  $\gamma = -0,6221$ ). Jednotlivé typy pohybu nekorelovaly s produkcí žádného dalšího extracelulárního produktu ani mezi sebou navzájem.

### 4.6.1 Korelace mezi tvorbou biofilmu a ostatními faktory virulence

Pozitivní korelace byla zjištěna pouze mezi produkcí submerzního a aerovaného biofilmu ( $p \ll 0,0001$ ;  $\gamma = 0,5694$ ).

Negativní korelace byla u močových katétrů pozorována mezi produkcí submerzního biofilmu a hemolyzinů ( $p = 0,0446$ ;  $\gamma = -0,9623$ ) a submerzního biofilmu a pigmentů (pyochelinu  $p = 0,0008$ ;  $\gamma = -0,5393$  a pyocyaninu  $p \ll 0,0001$ ;  $\gamma = -0,6055$ ). Produkce submerzního biofilmu u cévních katétrů negativně korelovala se sekrecí pyochelinu ( $p = 0,0061$ ;  $\gamma = -1$ ). Celkově (bez rozlišení močových a cévních katétrů) pak byla prokázána negativní korelace mezi produkcí submerzního biofilmu a hemolyzinů ( $p = 0,0441$ ;  $\gamma = -0,9623$ ) a submerzního biofilmu a pigmentů (pyochelinu  $p = 0,0001$ ;  $\gamma = -0,5159$  a pyocyaninu  $p \ll 0,0001$ ;  $\gamma = -0,4792$ ).

Naopak pozitivní korelace (i když s nižším korelačním koeficientem) byla zjištěna mezi produkcí aerovaného biofilmu a pigmentů – pyoverdinů i pyocyaninu ( $p = 0,0009$ ;  $\gamma = 0,4343$ ; resp.  $p = 0,0160$ ;  $\gamma = 0,3931$ ).

## 4.7 Antibiotické zátky

### 4.7.1 Stanovení hodnot MIC, MBC

Hodnoty MIC a MBC byly testovány mikrodiluční metodou. Výsledky 12 kmenů použitých pro testování účinnosti antibiotické zátky jsou shrnuty v tabulce 8. Kmeny označené jako citlivé byly senzitivní k ciprofloxacinu (výjimka je kmen 67JB), kmeny označené jako rezistentní byly k danému ATB necitlivé. Všechny kmeny byly citlivé k amikacinu (výjimka je kmen 64AC).

### 4.7.2 Antibiotické zátky

Účinnost antibiotické zátky s amikacinem, ciprofloxacinem a etanolem (i v kombinaci s citrátem sodným) byla testována na 12 fenotypově odlišných kmenech. Souhrnné výsledky jsou uvedeny na obrázku 19 a v tabulce 9.

Amikacin vykazoval dobrý účinek již při nejnižší koncentraci (eradikace 9 kmenů včetně kmene 64AC, který měl MIC 16 mg/l a byl tudíž hodnocen jako rezistentní). Rezistentní k 0,5mg/ml amikacinu zůstaly 3 kmeny (všechny byly citlivé při testování MIC). Při vyšší koncentraci (1; 2; 4 mg/ml) byl biofilm eradikován u 11 kmenů. Poslední kmen

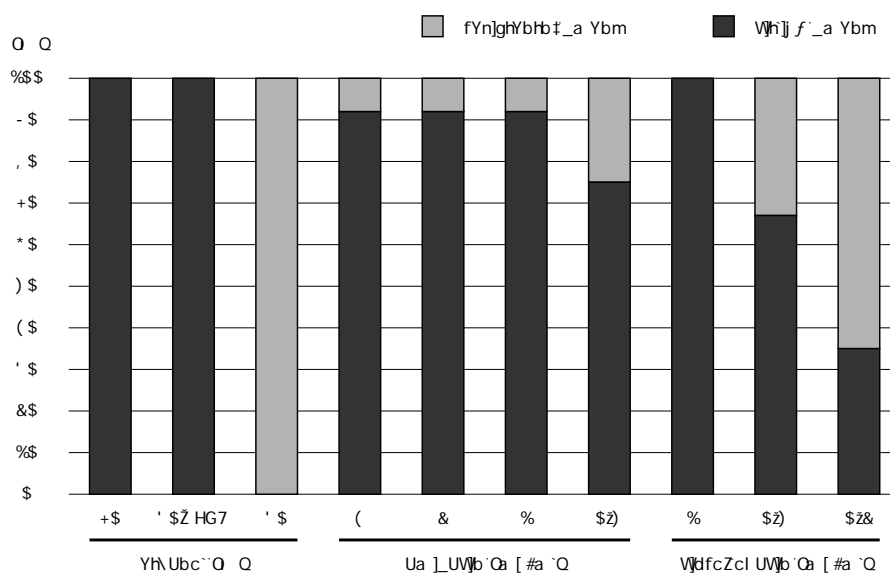
**Tabulka 8:** Hodnoty MIC a MBC pro izoláty, které byly použity pro testování účinnosti ATB zátky.

Kmeny		ciprofloxacin		amikacin	
		MIC [mg/l]	MBC [mg/l]	MIC [mg/l]	MBC [mg/l]
rezistentní	29GB	8	126	1	8
	33KA	8	8	1	1
	52NC	8	256	1	1
	64AC	8	16	1	16
	81AD	8	32	2	2
	96BC	64	64	1	1
citlivé	65MB	< 0,063	< 0,063	1	0,125
	01TB	< 0,063	< 0,063	0,5	1
	37SB	0,125	0,125	0,25	1
	33RC	< 0,063	0,125	1	2
	88EB	< 0,063	< 0,063	0,25	0,25
	67JB	8	16	0,5	1

byl velmi rezistentní k uvedenému antibiotiku, biofilm byl eliminován až při koncentraci 8 mg/ml (kmen byl však citlivý k ciprofloxacinu už při nejnižší koncentraci).

Ciprofloxacin při nejnižší koncentraci (0,2 mg/ml) eradikoval pouze polovinu citlivých kmenů a žádný kmen z rezistentní skupiny. Při koncentraci 0,5 mg/ml byla k zátce citlivá polovina kmenů z rezistentní skupiny a 1 kmen s citlivé skupiny. Při nejvyšší koncentraci (1 mg/ml) byly všechny kmeny citlivé.

Etanol při koncentraci 70 % a 30 % + 4 % citrátu sodného eradikoval biofilm u všech 12 kmenů. Roztok 30% etanolu (bez suplementace citrátem sodným) byl naopak naprosto neúčinný.



**Obrázek 19:** Celkové výsledky testování účinnosti ATB zátek bez ohledu na fenotyp testovaného kmene. TSC – citrát sodný.

**Tabulka 9:** Výsledky testování účinnosti ATB zátek rozdělené podle fenotypu testovaných kmenů. Číslo v buňce udává počet kmenů citlivých k dané zátku. Šedě podbarvené buňky označují zátku, která eradikovala všechny izoláty z dané skupiny. TSC – citrát sodný.

Kmeny	etanol [%]			amikacin [mg/ml]				ciprofloxacin [mg/ml]		
	70	30 TSC	30	4	2	1	0,5	1	0,5	0,2
rezistentní, pohyblivé	3	3	0	3	3	3	3	3	1	0
citlivé, pohyblivé	3	3	0	3	3	3	3	3	2	0
rezistentní, nepohyblivé	3	3	0	2	2	2	2	3	2	2
citlivé, nepohyblivé	3	3	0	3	3	3	3	3	3	1



## 5 DISKUZE

*Pseudomonas aeruginosa* je obávaným nozokomiálním patogenem. Díky nízkým nárokům na prostředí je prakticky ubikvitní. Lékařské vybavení, personál i okolní prostředí představují zdroj kontaminace katétru. Selektivní tlak antibiotik v nemocničním prostředí vede ke vzniku a šíření multirezistentních kmenů. Schopnost mikroba perzistovat v podobě biofilmu komplikuje léčbu a způsobuje chronicitu pseudomonádových infekcí.

Při rozvoji pseudomonádových infekcí hraje přítomnost jednotlivých faktorů virulence zásadní roli. Produkované faktory virulence se uplatňují při kolonizaci nativních i inertních povrchů, pomáhají pseudomonádám překonat obranné mechanismy hostitele a přežít v prostředí makroorganismu. Katérové infekce močových cest se podílejí až 40 % na celkovém počtu nozokomiálních infekcí (Mittal a kol. 2009). Katétrizace patří mezi hlavní rizikové faktory pro rozvoj močové infekce. Přes aseptická opatření při zavádění močového katétru se rozvine infekce u 50 % pacientů do dvou týdnů (Morris a Stickler 1998). Při zavedení močového i cévního katétru stoupá riziko rozvoje bakteriémie (Trautner a Darouiche 2004). Povrch katétru představuje vhodné prostředí pro adhezi bakterií i pro vytvoření biofilmu. Díky překlenutí některých obranných mechanismů hostitele se katétr stává přímou spojnicí do vnitřního prostředí organismu. *P. aeruginosa* je jedním z nejčastějších původců nozokomiálních močových infekcí u katétrizovaných pacientů (Mittal a kol. 2009). Infekce cévních katétrů způsobuje mikrob sice méně často, jsou však spojeny s vysokou mortalitou (Kolář 2003).

Všechny faktory virulence v rámci studie byly testovány fenotypovými metodami. Přestože jsou k dispozici i metody molekulárně-biologické, přítomnost genetické informace v genomu není zárukou její exprese. Vztahem mezi přítomností genu a fenotypovým projevem se zabývali např. Růžička a kol. (2004). Z jejich výsledků vyplývá, že *ica* operon (nezbytný pro tvorbu biofilmu u stafylokoků) je exprimován pouze u 70–85 % kmenů. Nicméně genetické metody jsou pro svou rychlost a jednoduchou interpretaci vhodným nástrojem pro detekci kmenů s potenciálně vysokou virulencí. Produkce jednotlivých faktorů virulence není neměnná, lze ji ovlivnit kultivačním médiem, teplotou, kultivační fází nebo přítomností temperovaných fágů (Vaca a kol. 1989).

### 5.1 Tvorba biofilmu

Tvorba biofilmu byla detekována u většiny izolátů. Ve zkoumaném souboru bylo zjištěno více producentů aerovaného než submerzního biofilmu (85,1 %, resp. 80,6 %). Rovněž většina kmenů (30 z 34 kmenů, 88,2 %), které byly vyhodnoceny jako biofilm-negativní při

testování submerzního biofilmu, byly schopny vytvářet aerovaný biofilm. Mezi tvorbou submerzního biofilmu v mikrotitrační destičce a v polystyrenových zkumavkách nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ( $p = 0,6538$ ;  $t = -0,4490$ ). Pouze 4 kmeny netvořily žádný typ biofilmu. Mezi tvorbou submerzního a aerovaného biofilmu byla prokázána pozitivní korelace ( $p \ll 0,0001$ ;  $\gamma = 0,5694$ ). Z kmenů, u kterých byla tvorba aerovaného biofilmu kvantifikována, bylo 85 % izolátů vyhodnoceno jako silní producenti. Výše uvedená data naznačují, že standardní metoda detekce tvorby biofilmu v mikrotitrační destičce nepostihuje všechny varianty biofilmu. To je však dáno spíše omezenými možnostmi zpracování aerovaného biofilmu v mikrotitrační destičce než tím, že by se v mikrotitrační destičce aerovaný biofilm netvořil. Jeho přítomnost byla během experimentů opakovaně zaznamenána. Častější produkce aerovaného biofilmu oproti biofilmu submerznímu může být dána faktem, že *P. aeruginosa* je aerobní organizmus. V případě infekcí močových a cévních katétrů však podmínky více odpovídají podmínkám při testování submerzního biofilmu, a proto v těchto případech stanovení submerzního biofilmu poskytuje lepší informaci o schopnosti mikroba tvořit klinicky významný biofilm.

Studiu submerzního biofilmu je věnována velká pozornost už 30 let. Četné studie prokazují význam biofilmu v klinické mikrobiologii díky nižší vnímavosti buněk k antimikrobním zásahům, což vede k rozvoji perzistentních obtížně léčitelných infekcí – viz např. review Donlan a Costerton (2002). Aerovaný biofilm je nově zkoumanou strukturou, která je nacházena u mnoha druhů (Kaplan a Mulks 2005, Martí a kol. 2011). Role aerovaného biofilmu v patogenezi pseudomonádových infekcí nebyla zatím objasněna. Jednotlivé typy aerovaného biofilmu byly od sebe dobře odlišitelné. Množství hmoty biofilmu bylo dobře patrné u kompaktního a částečně i u vizkózního typu. Vzhledem k hrudkovité struktuře vločkovitého typu nebylo možné hmotu biofilmu nijak odhadnout. Přesné informace o množství aerovaného biofilmu poskytlo spektrofotometrické stanovení. V předchozích studiích byla tvorba aerovaného biofilmu u rodu *Pseudomonas* sledována především u přírodních kmenů *P. aeruginosa*, např. Ude a kol. (2006) ji detekovali v případě 76 % půdních izolátů, kde může hrát významnou roli při kolonizaci povrchu rostlin. Autoři bohužel množství aerovaného biofilmu nijak nekvantifikovali.

## 5.2 Pohyblivost

Mezi sledovanými izoláty vykazovaly téměř všechny kmeny schopnost *swarming* a *swimming* motility (99,4 %, resp. 94,9 %). Pohyblivost na rozhraní pevných fází (*twitching* motilita) byla detekována u menšího počtu kmenů (72,6 %). Pohyblivost katérových izolátů sledovaných v této studii byla vyšší než detekovali Deligianni a kol. (2010) a Leone a

kol. (2008) u kmenů izolovaných u plíc pacientů s CF. Shodně u obou autorů *swimming* a *swarming* motilitu vykazovala polovina kmenů, *twitching* motilitu dokonce Deligianni a kol. (2010) zjistili pouze u třetiny izolátů. Již dříve však byl prokázán pokles pohyblivosti stejně jako jiných faktorů virulence u chronicky kolonizovaných pacientů s CF (Mahenthiralingam a kol. 1994). Také v rámci naší studie bylo nejméně izolátů pohyblivých pomocí *twitching* motility, přesto byl tento pohyb zaznamenán u více než 70 % kmenů. Celkově byl počet pohyblivých kmenů dvakrát vyšší než ve výše uvedených studiích. U katérových infekcí je schopnost pohybu pro klinické izoláty velmi výhodná, protože umožňuje snadnější a rychlejší kolonizaci katétru, odkud se pak mohou šířit do vnitřního prostředí makroorganismu. Vliv především *swarming* motility na kolonizaci močových katétrů a následně močového traktu byl popsán u rodu *Proteus* (Jones a kol. 2004, Stickler a Hughes 1999). Taktéž téměř všechny naše izoláty byly schopné *swarming* motility a tudíž pohybu na povrchu katétru. Význam dalších typů pohybu (*swimming*, *twitching*) nebyl v literatuře řešen. Lze však předjímat, že plavání (*swimming* motilita) by se mohla uplatit při pohybu např. ve sběrných nádobách. V samotném močovém katétru bude význam *swimming* motility slabší díky proudu moče. Mezi sledovanými typy pohybu nebyla zjištěna žádná korelace.

## 5.3 Tvorba extracelulárních látek

### 5.3.1 Tvorba hemolyzinů

*P. aeruginosa* produkuje dva typy hemolyzinů – fosfolipázu C a rhamnolipidy, které působí synergicky při degradaci komponent plazmatické membrány a poškození tkání (Ostroff 1989). Produkce hemolyzinů, stejně jako dalších extracelulárních enzymů, je typická pro stacionární fázi růstu (Stehling a kol. 2008). Proto byly kmeny nejprve kultivovány 18 hod do optické denzity 3 dle McFarlandovy stupnice, než bylo zahájeno vlastní stanovení hemolyzinů. V testovaném souboru všechny kmeny až na jeden tvořily hemolyziny, které byly detekovány po kultivaci na krevním agaru i pomocí spektrofotometrického testu. Tři kmeny se jeví jako neprodukující na krevním agaru, avšak při spektrofotometrickém testu byly vyhodnoceny jako producenti hemolyzinů. Při opakované kultivaci kmenů na krevním agaru vyšlo najevo, že kmeny produkují hemolyziny velmi slabě a pouze pod koloniemi, což nebylo zaznamenáno při první kultivaci. Zjistit takovou produkci hemolyzinů při rutinním testování je velmi obtížné.

Vysoké procento kmenů produkujících hemolyziny koresponduje se pozorováním ostatních autorů, kteří detekovali hemolyziny u většiny izolátů z močových infekcí (Mittal a

kol. 2006, Woods 1986). Studie Mittala a kol. (2006) také naznačuje, že hemolytické vlastnosti kmene mohou hrát významnou roli při kolonizaci močového ústrojí. Přítomnost hemolysinů u kmene zvyšuje počty bakterií při kolonizaci ledvin a vede k zánětlivé odezvě hostitele. Hemoliziny zpřístupňují  $\text{Fe}^{3+}$ , narušují funkci fagocytů a poškozují hostitelské tkáně. Přítomnost kmenů s produkcí hemolysinů však není typická pouze pro uroizoláty. Vysoké procento kmenů produkujících hemoliziny bylo prokázáno u přírodních izolátů z pitné vody (Silva a kol. 2008). Naopak nižší produkci hemolysinů zaznamenali Stehling a kol. (2008), kteří sledovali mukózní a nemukózní izoláty z plic a porovnávali je s izoláty z jiných míst. Hemoliziny byly u všech skupin produkovány jen asi polovinou kmenů.

### 5.3.2 Tvorba LasB elastázy

LasB elastáza je proteolytický enzym zodpovědný za destrukci hostitelských tkání. Pro sekreci enzymu platí stejné pravidlo jako pro tvorbu hemolysinů, tj. že je produkován až ve stacionární fázi růstu (Stehling a kol. 2008). Taktéž produkce LasB elastázy byla testována po 18hod kultivaci v suspenzi o denzitě 3 dle McFarlandovy stupnice. Produkce enzymu byla mezi katéetrovými izoláty běžná (protein byl detekován u 85 % kmenů).

Studie Mittala a kol. (2006) zjistila produkci enzymu u 61 % kmenů z močových infekcí. Kmeny byly schopné kolonizovat tkáň ledvin, celkové počty bakterií však byly nízké a nebyl prokázán vztah mezi produkcí proteolytického enzymu a kolonizací ledvin. Produkce LasB elastázy se vyskytuje i u izolátů z jiných oblastí – shodně u 80 % izolátů ji detekovali Stehling a kol. (Stehling a kol. 2008) u mimoplicných izolátů a Dénervaud a kol. (2004) u infekcí spojených se zavedením umělé plicní ventilace. Degradace elastinu jakožto jedné ze základních složek pojivové tkáně může být jedním z rozhodujících faktorů pro rozvoj infekce bez ohledu na její lokalizaci (Stehling a kol. 2008).

### 5.3.3 Tvorba pigmentů

Tvorba pigmentů byla kromě testování na speciálních médiích odečtena i na MH agaru. Nejlépe byl na MH agaru patrný pyocyanin, ostatní dva pigmenty nebyly až na výjimky na MH agaru zaznamenány (v úvahu připadá i zastínění pyocyaninem u kmenů, které produkovaly současně oba pigmenty). Přesto byl pyocyanin detekován pouze u 45 % kmenů oproti detekci na speciálním médiu. Pyocyanin je toxický pro eukaryotické buňky. Jeho účinky byly sledovány především u pacientů s CF (Jacob a kol. 2011, Liu a Nizet 2009), u kterých zvyšuje množství reaktivních forem kyslíku v plicích a v konečném důsledku vede k apoptóze buněk. Současná studie McDermotta a kol. (2012) ukazuje obdobné

změny u buněk močového traktu po vystavení pyocyaninu.

Tři čtvrtiny kmenů sekretovaly při kultivaci na speciálním médiu pyoverdin, který se spolu pyochelinem podílí na vychytávání iontů železa. Vyšší koncentrace železa zvyšuje virulenci mikroba (Singh a kol. 2002). Ze 139 kmenů, jež sekretovaly pyoverdin, pouze 10 (7,2%) současně produkovalo pyochelin, což lze vysvětlit nižší afinitou pyochelinu k  $\text{Fe}^{3+}$ . Pokud je produkce pyoverdinu dostačující pro záchyt železa, nebude mikrob vynakládat energii na syntézu dalšího sideroforu. Naopak 5 kmenů, jež netvořily pyoverdin, bylo schopno produkovat pyochelin. Pyochelin je aktivní při jiném pH než pyoverdin, což může být za určitých podmínek výhodné. Celková produkce sideroforů byla nižší než detekovali Mittal a kol. (2006) u uroizolátů.

## 5.4 Citlivost k antibiotikům

Nejvíce účinnými ATB byla kolistin a amikacin s účinností více než 90%, 18 kmenů bylo citlivých pouze k těmto dvěma ATB. Celkem 106 kmenů bylo rezistentní k 0–4 testovaným ATB, 29 kmenů bylo rezistentní k 5–8 ATB a 40 kmenů bylo rezistentní k 9–12 ATB (30 izolátů z močových katétrů a 10 izolátů z cévních katétrů). 62,5% kmenů z nejméně citlivé skupiny navíc produkovalo AmpC  $\beta$ -laktamázu. Žádný kmen nebyl rezistentní ke všem 13 testovaným ATB.

### Detekce $\beta$ -laktamáz

Inducibilní AmpC byla produkována pouze u 80% kmenů necitlivých k ceftazidimu a cefepimu. U zbylých 20% se na rezistenci k  $\beta$ -laktamům podílel jiný mechanismus rezistence než produkce  $\beta$ -laktamáz (pravděpodobně eflux a nižší permeabilita buněčné stěny). Inducibilní AmpC je u pseudomonád obvykle chromozomálně kódovaná a začíná být exprimována po kontaktu s induktorem (kys. klavulanová, cefoxitim) (Hrabák a kol. 2009). Pacienti infikovaní kmeny, které produkují AmpC (i inducibilní), by neměli být léčeni cefalosporiny první až třetí generace. Použití cefepimu by mělo být zvaženo u každého izolátu zvláště s ohledem na změnu citlivosti za přítomnosti inhibitoru AmpC (srovnání inhibiční zóny na MH a MH s oxacilínem) (Hrabák a kol. 2009).

MBL byla prokázána u 7 kmenů pomocí fenotypového *double disc synergy* testu, ale pouze u 2 kmenů byla produkce enzymu confirmována. K falešně pozitivním výsledkům při *double disc synergy* testu může dojít díky interakci chelátoru s komponenty vnější membrány bakterie (Hrabák a kol. 2007). Žádný z kmenů neprodukoval současně MBL a AmpC. Producenti MBL byly citliví pouze ke kolistinu, resp. kolistinu a amikacinu.

Zbýlých 5% kmenů rezistentních ke karbapenemům využívalo jiný typ rezistence (efflux, ztráta porinu OprD) (Livermore 2002). Producent MBL je pokládán za rezistentní ke všem karbapenemům a cefalosporinům bez ohledu na výsledky diskové citlivosti (Hrabák a kol. 2007). Geny kódující MBL mohou být horizontálně přenášeny mezi druhy (např. mezi *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., enterobakteriemi). Na mobilních genetických elementech bývají neneseny další geny rezistence (např. geny pro aminoglykosidové acetyltransferázy nebo geny zodpovědné za rezistenci k chinolonům). Léčba infekcí způsobených takovými izoláty je významně omezena, účinný zůstává obvykle pouze kolistin.

## 5.5 Korelace mezi faktory virulence

Mezi produkcí extracelulárních látek byla zaznamenána pozitivní korelace v několika případech, negativní korelace detekována nebyla. Přestože vysoká produkce extracelulárních látek byla sledována v několika studiích (Mittal a kol. 2006, Silva a kol. 2008, Woods 1986) u izolátů různého původu, v žádné studii nebyly hodnoceny vztahy mezi faktory virulence a výsledky tedy nelze porovnat s pozorováním jiných autorů. Korelace se lišily mezi izoláty z močových a cévních katétrů. Celkově vykazovaly izoláty z močových katétrů více korelací mezi jednotlivými faktory virulence.

Sekrece některých extracelulárních látek negativně korelovala s produkcí submerzního biofilmu, což odpovídá pozorování, že v biofilmu dochází k poklesu produkce většiny extracelulárních látek jako jsou hemolyziny nebo pyochelin (Yadav a kol. 2004, Deligianni a kol. 2010). Překvapením bylo, že pro aerovaný a submerzní biofilm a produkci pigmentů platí opačný vztah (negativní korelace pro submerzní biofilm a pozitivní korelace pro aerovaný biofilm). Tvorba biofilmu je stejně jako sekrece sideroforů řízena QS systémem. Pseudomonádový chilononový signál pozitivně ovlivňuje produkci sideroforů u *P. putida*, přičemž tvorba submerzního biofilmu je za těchto podmínek potlačena (Fernández-Piñar a kol. 2011). Vztah mezi produkcí aerovaného biofilmu a sideroforů zatím nebyl detailněji zkoumán. Možným vysvětlením je, že podmínky v aerovaném biofilmu jsou odlišné od podmínek v submerzním biofilmu. Lze uvažovat o nedostatku železa v horní vrstvě média a tím pádem potřebě mikroba sekretovat siderofory. Produkce pigmentů byla při práci s aerovaným biofilmem opakovaně zaznamenána v horní části kultivační nádoby, ale během kultivace submerzního biofilmu zaznamenána nebyla.

Izoláty z močových a cévních katétrů se od sebe liší pouze ve schopnosti tvorby submerzního biofilmu ( $p = 0,0111$ ;  $t = 2,5670$ ). Kmeny izolované z cévních katétrů tvoří biofilmu více, což může mít negativní dopad na léčbu pseudomonádových bakteriemi způsobených zavedením cévního katétru.

Z výsledků vyplývá, že vztahy mezi jednotlivými faktory virulence jsou složité (např. opačný vztah mezi sekrecí hemolyzinů a různými typy motility, nebo mezi produkcí pigmentů a submerzním a aerovaným biofilmem) a nejsou stále zcela objasněny.

## 5.6 Antibiotické zátky

Pro testování účinnosti ATB zátky byly vybrána dvě na koncentraci závislá ATB – ciprofloxacin a amikacin. Optimální baktericidní účinek se u těchto ATB dostavuje při koncentraci nejméně 8–10 krát vyšší než MIC (Andes a Craig 1998). Amikacin je účinný především proti nově tvořenému biofilmu, naopak ciprofloxacin účinkuje i proti vyžralému biofilmu a navíc má dobré penetrační vlastnosti (Tenke a kol. 2006). Je však nutné brát na vědomí fakt, že obě ATB prostupují biofilmem s určitou časovou prodlevou (Hatch a Schiller 1998, Suci a kol. 1994).

V našem pokusu byly vyhodnoceny nejlépe zátky s 70% etanolem, 30% etanolem se 4% citrátu sodného, 1 mg/ml ciprofloxacinem. Jako naprosto neúčinný se ukázal roztok 30% etanolu (bez suplementace citrátem sodným), účinnost 0,2 mg/ml ciprofloxacinu byla pouze 25%. Rozdíly v účinnosti zátky v závislosti na fenotypu byly porozovány mezi citlivými a rezistentními kmeny, pohyblivost mikroba nehrála roli.

Výsledky korespondují s pozorováním ostatních autorů, kteří detekovali účinnost ciprofloxacinu *in vitro* při koncentraci 1 mg/ml (Lee a kol. 2007) a *in vivo* při koncentraci 2 mg/ml (Fernandez-Hidalgo a kol. 2006). Pro amikacin byla zjištěna účinná koncentrace 1 mg/ml *in vitro* (Lee a kol. 2007). Etanol (70%) eradikoval biofilm v několika *in vivo* studiích (Dannenberga a kol. 2003, Onland a kol. 2006), taktéž účinnost 30% etanolu spolu s citrátem byla sledována u infekcí způsobených gramnegativními i grampozitivními patogeny, dokonce u kvasinkových infekcí (Maharaj a kol. 2008, Takla a kol. 2007). Použití nižší koncentrace etanolu může zabránit vzniku negativních vedlejších účinků zátky (zvracení, bolest hlavy) po aplikaci zátky (Maharaj a kol. 2008). Použití chelatačního činidla (citrátu sodného) je doporučováno jako alternativa k heparinu, který je jako antikoagulant často přidáván do roztoku zátky (Raad a kol. 2008). Stejně jako v diplomové práci Lee a kol. (2007) došli k závěru, že při aplikaci zátky nehraje hodnota MIC výraznou roli. Kmeny, které byly podle hodnoty MIC hodnoceny jako citlivé, mohou být v biofilmu rezistentní, což je způsobeno faktem, že MIC se vztahuje k planktonickým buňkám, které jsou k ATB více citlivé než buňky v biofilmu (Mah a O'Toole 2001, Nadell 2009). Antibiotické zátky představují alternativu v léčbě infekcí především dlouhodobě zavedených tunelizovaných katétrů. Další možností snížení výskytu patogenů je vývoj antimikrobního povrchu katétru (Sousa 2011). V současnosti jsou používány povrchy katétrů, které jsou

schopny oddálit mikrobiální kolonizaci, ale nedokáží zcela zabránit rozvoji mikrobiální flóry při dlouhodobém zavedení katétru.



## 6 ZÁVĚR

Produkce sledovaných faktorů virulence byla u katérových izolátů vysoká. Prakticky všechny kmeny byly pohyblivé (jedním nebo více typy pohybu) a tvořily biofilm (aerovaný a/nebo submerzní), více než 70 % kmenů sekretovalo jednotlivé exoenzymy. Vysoké procento kmenů tvořilo také pyoverdin – siderofor vychytávající esenciální ionty železa z prostředí. Nejvíce účinnými antibiotiky byly kolistin a amikacin. Z antibiotických zátek eradikovaly biofilm u všech kmenů zátky s 70% etanolem, 30% etanolem se 4 % citrátu sodného, 1 mg/ml ciprofloxacinem.

Motilita a schopnost tvořit biofilm jsou důležité faktory pro vytvoření mikrobiálního ložiska např. v lumen katétru. Extracelulární látky napomáhají degradaci tkání a rozvoji infekce. Antibiotická rezistence znemožňuje odstranění mikrobů z těla hostitele. Přesné vztahy mezi produkcí jednotlivých faktorů virulence však nejsou dosud zcela objasněny. V rámci studie byla pozitivní korelace prokázána mezi produkcí některých extracelulárních látek a také mezi produkcí submerzního a aerovaného biofilmu. Sekrece hemolyzinů vykazovala opačné vztahy k různým typům motility. Tvorba pigmentů korelovala negativně se schopností kmene tvořit submerzní biofilm a pozitivně s produkcí aerovaného biofilmu. Všechny prokázané korelace byly významné na hladině  $p = 0,05$  a vykazovaly korelaci vyšší nebo rovna 40 % ( $\gamma > 0,40$ ).

Nozokomiální infekce spojené s přítomností katétru jsou významným problémem soudobé klinické léčby ve vyspělých zemích. Katérové infekce představují další zátěž pro oslabený organizmus, prodlužují pobyt v nemocnici a mají i nezanedbatelný ekonomický dopad. Stanovení faktorů virulence u jednotlivých kmenů je důležitým vodítkem pro zhodnocení významu kmene (kolonizátor vs. kmen s výraznou virulencí). Porozumění vztahům mezi faktory virulence je nezbytné pro pochopení patogeneze onemocnění způsobených *Pseudomonas aeruginosa*. Tyto znalosti mohou vést ke zlepšení a zefektivnění léčby pseudomonádových infekcí, zejména těch, které jsou spojené s tvorbou biofilmu. Adekvátní terapeutické zásahy by mohly vést ke snížení počtu pseudomonádových infekcí a tím i k úspoře nákladů s těmito infekcemi spojenými.

---

## LITERATURA

- Ader F., Le Berre R., Faure K., Gosset P., Epaulard O., Toussaint B., Polack B., Nowak E., Viget N.B., Kipnis E., Guery B.P.** (2005): Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system. *Infect. Immun.* 73: 4263–4271.
- Adonizio A., Kong K.F., Mathee K.** (2008): Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52: 198–203.
- Andes D., Craig W. A.** (1998): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of outpatient intravenous antimicrobial therapy. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 12: 849–860.
- Andrews S.C., Robinson A.K., Rodriguez-Quinones F.** (2003): Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 215–237.
- Bachofen R., Siegrist J.** (2008): Microbiology manual. 3<sup>rd</sup> ed., Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis. 553 p.
- Bazire A., Diab F., Taupin L., Rodrigues S., Jebbar M., Dufour A.** (2009): Effects of osmotic stress on rhamnolipid synthesis and time-course production of cell-to-cell signal molecules by *Pseudomonas aeruginosa*. *Open. Microbiol. J.* 13: 128–135.
- Bednář M., Souček A., Vávra J.** (1994): Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie. Triton. Praha. 226 s.
- Berka R., Gray G., Vasil M.** (1981): Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 34: 1071–1074.
- Bjarnsholt T., Givskov M.** (2007): The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 409–414.
- Bodey G.P., Bolivar R., Fainstein V., Ladeja L.** (1983): Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* 5: 279–313.
- Brandel J., Humbert N., Elhabiri M., Schalk I. J., Mislin G. L., Albrecht-Gary A. M.** (2012): Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical characterization of the iron(iii), copper(ii) and zinc(ii) complexes. *Dalton Trans.* 41: 2820–2834.
- Breidenstein E. B. M., de la Fuente-Núñez C., Hancock R. E. W.** (2011): *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 19: 419–426.
- Burrows L. L.** (2005): Weapons of mass retraction. *Mol. Microbiol.* 57: 878–888.
- Ciofu O., Lee B., Johannesson M., Hermansen N., Meyer P., Hoiby N., Study S. C. F.** (2008): Investigation of the algT operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. *Microbiology.* 154: 103–113.

- Cogan N. G., Gunn J. S., Wozniak D. J.** (2011): Biofilms and infectious diseases: biology to mathematics and back again. *FEMS Microbiol. Lett.* 322: 1–7.
- Cornelis P.** (2010): Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 1637–1645.
- Costerton J. W.** (1999): Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 11: 217–221.
- Dannenbreg C., Bierbach U., Rothe A., Beer J., Korholz D.** (2003): Ethanol-lock technique in the treatment of bloodstream infections in pediatric oncology patients with broviac catheter. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 25: 616–621.
- David A., Risitano D. C., Mazzeo G., Sinardi L., Venuti F. S., Sinardi A. U.** (2005): Central venous catheters and infections. *Minerva Anesthesiol.* 71: 561–564.
- del Pozo J. L.** (2009): Role of antibiotic lock therapy for the treatment of catheter-related bloodstream infections. *Int. J. Artif. Organs.* 32: 678–688.
- Deligianni E., Pattison S., Berrar D., Ternan N. G., Haylock R. W., Moore J. E., Elborn S. J., Dooley J. S.** (2010): *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro. *BMC Microbiol.* 8: 10–38.
- Dénervaud V., TuQuoc P., Blanc D., Favre-Bonté S., Krishnapillai V., Reimann C., Haas D., van Delden C.** (2004): Characterization of cell-to-cell signaling-deficient textit*Pseudomonas aeruginosa* strains colonizing intubated patients. *J. Clin Microbiol.* 42: 554–562.
- Déziel E., Comeau Y., Villemur R.** (2001): Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacteriol.* 183: 1195–1204.
- Dietrich L. E., Price-Whelan A., Petersen A., Whiteley M., Newman D. K.** (2006): The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 61: 1308–1321.
- Donlan R. M., Costerton, J. W.** (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167–193.
- Droste J. C., Jeraj H. A., MacDonald A., Farrington K.** (2003): Stability and in vitro efficacy of antibiotic-heparin lock solutions potentially useful for treatment of central venous catheter-related sepsis. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 849–855.
- EARSS – European Antimicrobial Resistance Surveillance System** [online]; citováno 02.05.2012; dostupné na: [www.szu.cz/earsnet/patogen.php](http://www.szu.cz/earsnet/patogen.php).

- Farinha M. A., Conway B. D., Glasier L. M., Ellert N. W., Irvin R. T., Sherburne R., Paranchych W.** (1994): Alteration of the pilin adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* PAO results in normal pilus biogenesis but a loss of adherence to human pneumocyte cells and decreased virulence in mice. *Infect. Immun.* 10: 4118–4123.
- Fernandez-Hidalgo N., Almirante B., Calleja R., Ruiz I., Planes A. M., Rodriguez D., Pigrau C., Pahissa A.** (2006): Antibiotic-lock therapy for long-term intravascular catheter-related bacteraemia: results of an open, non-comparative study. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 1172–1180.
- Fernández-Piñar R., Cámara M., Dubern J. F., Ramos J. L., Espinosa-Urgel M.** (2011): The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone quorum sensing signal alters the multicellular behaviour of *Pseudomonas putida* KT2440. *Res Microbiol.* 162: 773–781.
- Fonseca A. P., Correia P., Extremina C. I., Sousa J. C., Tenreiro R., Barros H.** (2008): Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Portuguese Central Hospital. *Folia Microbiol.* 53: 540–546.
- Fuchs R., Schäfer M., Geoffroy V., Meyer J. M.** (2001): Siderotyping – a powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Curr. Top. Med. Chem.* 1: 31–57.
- Giwerzman B., Jensen E. T., Hoiby N., Kharazmi A., Costerton J. W.** (1991): Induction of beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1008–1010.
- Gowan J. R. W.** (1999): Pseudomonády a ostatní nefermentující tyčky. In: Greenwood D., Slack C. B., Peutherer J. F. [eds.]: Lékařská mikrobiologie – přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. 297–303. Grada. Praha.
- Häußler S., Ziegler I., Löttel A., Von Götz F., Rohde M., Wehmhöner D., Saravanamuthu S., Tümmler B., Steinmetz I.** (2003): Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J. Med. Microbiol.* 52: 295–301.
- Hamood A., Griswold J., Colmer J.** (1996): Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 64: 3154–3160.
- Hatch R. A., Schiller N. L.** (1998): Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 974–977.
- Hentzer M., Teitzel G., Balzer G., Heydorn A., Molin S., Givskov M., Parsek M.** (2001): Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* 183: 5395–5401.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T.** [eds.] (1994): *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed., Williams and Wilkins. Baltimore. 787 p.

- Houry A., Briandet R., Aymerich S., Gohar M.** (2010): Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*. 156: 1009–1018.
- Hrabák J., Bergerová T., Žemličková H., Urbášková P.** (2009): Detekce širokospektrých  $\beta$ -laktamáz (ESBL),  $\beta$ -laktamáz AmpC, metalo- $\beta$ -laktamáz (MBL) a karbapenemáz KPC u gramnegativních tyčků. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie*. 18(3).
- Hrabák J., Vaniš V., Bergerová T., Jindrák V., Chudáčková V., Urbášková P.** (2007): Průkaz metalo- $\beta$ -laktamáz (MBL) u gramnegativních bakterií. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 16(9).
- Chagneau C., Saier M. H. Jr.** (2004): Biofilm-defective mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8: 177–188.
- Iglewski B. H.** (1996) [online]: *Pseudomonas*. In: Baron S. [ed.]: *Medical Microbiology*. 4<sup>th</sup> ed., University of Texas Medical Branch at Galveston; citováno 14.01.2012; dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>.
- Irvin R. T.** (2008): Adherence of *Pseudomonas aeruginosa*, In: Rehm B. H. A. [ed.]: *Pseudomonas— Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. 45–77. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim.
- Jacob C., Jamier V., Ba L. A.** (2011): Redox active secondary metabolites. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15: 149–1455.
- Johnson M., Boese-Marrazzo D.** (1980): Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 29: 1028–1033.
- Jones B. V., Young R., Mahenthalingam E., Stickler D. J.** (2004): Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection. *Infect. Immun.* 72: 3941–3950.
- Kaplan J. B., Mulks M. H.** (2005): Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 108: 89–94.
- Kearns D. B.** (2010): A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 634–644.
- Kobayashi H., Kobayashi O., Kawai S.** (2009): Pathogenesis and clinical manifestations of chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* and its biofilms in the airway tract. *J. Infect. Chemother.* 15: 125–142.
- Köhler T., Curty L., Barja F., Van Delden C., Pechère J.** (2000): Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* 182: 5990–5996.
- Kolář M.** (2003): Nozokomiální infekce z pohledu mikrobiologa. *Nozokomiálne nákazy*. 2: 22–38.

- Koza A., Hallett P. D., Moon C. D., Spiers A. J.** (2009): Characterization of a novel air-liquid interface biofilm of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Microbiology*. 155: 1397–1406.
- Lee M. Y., Ko K. S., Song J. H., Peck K. R.** (2007): In vitro effectiveness of the antibiotic lock technique (ALT) for the treatment of catheter-related infections by *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 782–787.
- Lee V., Smith R., Tummler B., Lory S.** (2005): Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. *Infect. Immun.* 73: 1695–1705.
- Leone I., Chirillo M. G., Raso T., Zucca M., Savoia D.** (2008): Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27: 1093–1099.
- Liang Y., Gao H., Chen J., Dong Y., Wu L., He Z., Liu X., Qiu G., Zhou J.** (2010): Pellicle formation in *Shewanella oneidensis*. *BMC Microbiol.* 16: 10: 291.
- Lipový B., Řihová H., Hanslianová M., Burgetová D., Kaloudová Y., Suchánek I., Brychta P.** (2010): Změna bakteriálního spektra na ranných plochách u těžce popálených pacientů. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 59: 34–8.
- Liptáková A., Siegfried L., Jarčuška P., Chréter I.** (2005): Vybrané mechanismy rezistence na antimikrobiálne látky u *Pseudomonas aeruginosa* a ich detekcia. *Klin. Mikrobiol. Inf. lék.* 109–111.
- Liu G. Y., Nizet V.** (2009): Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol.* 17: 406–413.
- Livermore D. M.** (2002): Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* 34: 634–640.
- Mah T. F., O'Toole G. A.** (2001): Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9: 34–39.
- Maharaj A. R., Zelenitsky S. A., Vercaigne L. M.** (2008): Effect of an ethanol/trisodium citrate hemodialysis catheter locking solution on isolates of *Candida albicans*. *Hemodial. Int.* 12: 342–347.
- Mahenthiralingam E., Campbell M. E., Speert D. P.** (1994): Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonised patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 62: 569–605.
- Mára M.** (1972): Metabolismus bakteriální buňky. In: Patočka F.: Lékařská mikrobiologie. 2. vyd., 59–90. Avicenum. Praha.
- Martí S., Rodríguez-Baño J., Catel-Ferreira M., Jouenne T., Vila J., Seifert H., Dé E.** (2011): Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Res. Notes.* 11: 4: 5.

- McDermott C., Chess-Williams R., Grant G. D., Perkins A. V., McFarland A. J., Davey A. K., Anoopkumar-Dukie S.** (2012): Effects of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin on human urothelial cell function and viability. *J. Urol.* 187: 1087–1093.
- McKane L., Kandel J.** (1996): *Microbiology – essential and applications*. 2<sup>nd</sup> ed., McGraw-Hill. New York. 843 p.
- Mermel L. A., Allon M., Bouza E., Craven D. E., Flynn P., O’Grady N. P, Raad I. I., Rijnders B. J., Sherertz R. J., Warren D. K.** (2009): Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 49: 1–45.
- Messing B., Peitra-Cohen S., Debure A., Beliah M., Bernier J. J.** (1988): Antibiotic-lock technique: a new approach to optimal therapy for catheter-related sepsis in home-parenteral nutrition patients. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 12: 185–189.
- Metcalf S. C., Chambers S. T., Pithie A. D.** (2004): Use of ethanol locks to prevent recurrent central line sepsis. *J. Infect. Jul.* 49: 20–22.
- Meyer J. M.** (2000): Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* 174: 135–142.
- Mittal R., Aggarwal S., Sharma S., Chhibber S., Harjai K.** (2009): Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *J. Infect. Public. Health.* 2: 101–111.
- Mittal R., Khandwaha R. K., Gupta V., Mittal P. K., Harjai K.** (2006): Phenotypic characters of urinary isolates of *Pseudomonas aeruginosa* & their association with mouse renal colonization. *Indian J. Med. Res.* 123: 67–72.
- Morris, N.S., Stickler, D.J.** (1998): Encrustation of indwelling urethral catheters by *Proteus mirabilis* biofilms growing in human urine. *J. Hosp. Infect.* 39: 227–234.
- Morrison D. C., Ryan J. L.** (1987): Endotoxins and disease mechanisms. *Annu. Rev. Med.* 38: 417–432.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A.** (2002): *Medical Microbiology*, 4<sup>th</sup> ed., Mosby. St. Louis. 826 p.
- Nadell C. D., Xavier J. B., Foster K. R.** (2009): The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 206–224.
- NCCLS – National committee for Clinical Laboratory Standards** (2003): *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*; approved standard – six edition, M7-A6, Wayne.
- Nickel J. C., Grant S. K., Costerton J. W.** (1985): Catheter-associated bacteriuria. An experimental study. *Urology* 26: 369–375.

- Obritsch M. D., Fish D. N., MacLaren R., Jung R.** (2005): Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy*. 25: 1353–1364.
- Ondrovčik P.** (2003): Gramnegativní nefermentující bakterie. In: Votava M. [ed.]: Lékařská mikrobiologie speciální, 29–37. Neptun. Brno.
- Onland W., Shin C. E., Fustar S., Rushing T., Wong W. Y.** (2006): Ethanol-lock technique for persistent bacteremia of long-term intravascular devices in pediatric patients. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 160: 1049–1053.
- Opilla M. T., Kirby D. F., Edmond M. B.** (2007): Use of ethanol lock therapy to reduce the incidence of catheter-related bloodstream infections in home parenteral nutrition patients. *J. PEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 31: 302–305.
- O’Toole G. A., Kolter R.** (1998): Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30: 295–304.
- Overhage J., Lewenza S., Marr A. K., Hancock R. E.** (2007): Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. *J. Bacteriol.* 189: 2164–2169.
- Ostroff R., Wretling B., Vasil M.** (1989): Mutations in the hemolytic-phospholipase C operon result in decreased virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 grown under phosphate-limiting conditions. *Infect. Immun.* 57: 1369–1373.
- Palleroni N. J.** (2005): Genus I. *Pseudomonas*. In: Garrity G. M., Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T. [eds.]: *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2*. 323–379. Springer Verlag. New York.
- Parsek M. T., Yahr T. L.** (1991): *Pseudomonas aeruginosa*. The prokaryotes. Springer Verlag. New York, LLC. 919 p.
- Pesci E. C., Milbank J. B., Pearson J. P., McKnight S., Kende A. S., Greenberg E. P., Iglewski B. H.** (1999): Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 11229–11234.
- Pettit R. K., Weber C. A., Kean M. J., Hoffmann H., Pettit G. R., Tan R., Franks K. S., Horton M. L.** (2005): Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 2612–2617.
- Pillar C. M., Hobden J. A.** (2002): *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and keratitis in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 1437–1444.
- Raad I., Fang X., Keutgen X. M., Jiang Y., Sherertz R., Hachem R.** (2008): The role of chelators in preventing biofilm formation and catheter-related bloodstream infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21: 385–392.



- Rampioni G., Schuster M., Greenberg E. P., Zennaro E., Leoni L.** (2009): Contribution of the RsaL global regulator to *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 301: 210–217.
- Rasband W.** (2011): ImageJ, version 1.45s, Bethesda, Maryland, USA; National Institutes of Health. dostupné na: <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>.
- Rodríguez-Baño J.** (2002) : Selection of empiric therapy in patients with catheter-related infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 8: 275–281.
- Rosypal S., Hoďák K.** (1981): Bakteriální pigmenty. In: Rosypal S. [ed.]: *Obecná bakteriologie*. 50–56. Státní pedagogické nakladatelství. Praha.
- Růžička F., Holá V.** (2008): Průkaz životaschopných, metabolicky aktivních kvasinkových buněk pomocí kolorimetrického media. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 57: 4–7.
- Růžička F., Holá V., Votava M., Tejkalová R., Horvát R., Heroldová M., Woznicová V.** (2004): Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol.*, 49: 596–600.
- Ryder C., Byrd M., Wozniak D. J.** (2007): Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* 10: 644–648.
- Saint S., Lipsky B. A.** (1999): Preventing Catheter-Related Bacteriuria: Should We? Can We? How? *Arch. Intern. Med.* 159: 800–808.
- Saliba M., Nascimento D. O., Silva M. C. A., Assis M. C., Gayer C. R. M., Raymond B., Coelho M. G. P., Marques E. A., Touqui L., Albano R. M., Lopes U. G., Paiva D. D., Bozza P. T., Plotkowski M. C.** (2005): Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of Saliba ExoU. *Cell. Microbiol.* 7: 1811–822.
- Sato H., Frank D. W.** (2004): ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol. Microbiol.* 53: 1279–1290.
- Savas L., Guvel S., Onlen Y., Savas N., Duran N.** (2006): Nosocomial urinary tract infections: micro-organisms, antibiotic sensitivities and risk factors. *West. Indian. Med. J.* 55: 188–193.
- Schultz D. R., Miller K. D.** (1974): Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. *Infect. Immun.* 10: 128–135.
- Sedláček I.** (2007): *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita. Brno. 270 s.
- Sherertz R. J., Boger M. S., Collins C. A., Mason L., Raad I. I.** (2006): Comparative in vitro efficacies of various catheter lock solutions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1865–1868.

- Silva M. E., Filho I. C., Endo E. H., Nakamura C. V., Ueda-Nakamura T., Filho B. P. (2008): Characterisation of potential virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 93: 323–334.
- Singh P. K., Parsek M. R., Greenberg E. P., Welsh M. J. (2002): A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. 417: 552–555.
- Sousa C., Henriques M., Oliveira R. (2011): Mini-review: Antimicrobial central venous catheters—recent advances and strategies. *Biofouling*. 27: 609–620.
- Stanier R. Y., Palleroni N. J., Doudoroff M. (1966): The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159–271.
- Starkey M., Hickman J., Ma L., Zhang N., De Long S., Hinz A., Palacios S., Manoil C., Kirisits M., Starner T., Wozniak D., Harwood C., Parsek M. (2009): *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J. Bacteriol.* 191: 3492–3503.
- StatSoft, Inc. (2011): STATISTICA (data analysis software system), version 10., dostupné na: [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Stehling E. G., Silveira W. D., Leite S. (2008): Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. *Braz. J. Infect. Dis.* 12: 86–88.
- Steinmetz I. (2003): Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J. Med. Microbiol.* 52: 295–301.
- Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. (2000): A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*. 40: 175–179.
- Stickler D., Hughes G. (1999): Ability of *Proteus mirabilis* to swarm over urethral catheters. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 206–208.
- Stover C., Pham X., Erwin A., Mizoguchi S., Warrenner P., Hickey M., Brinkman F., Hufnagle W., Kowalik D., Lagrou M., Garber R., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L., Coulter S., Folger K., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G., Wu Z., Paulsen I., Reizer J., Saier M., Hancock R., Lory S., Olson M. (2000): Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406: 959–964.
- Strateva T., Yordanov D. (2009): *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol.* 58: 1133–1148.
- Suci P. A., Mittelman M. W., Yu F. P., Geesey G. G. (1994): Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 38: 2125–2133.

- Šrámová H. a kolektiv** (1995): Nozokomiální nákazy. 1. vyd., 65–70. Maxdorf CJ esenius. Praha.
- Takla T. A., Zelenitsky S. A., Vercaigne L. M.** (2007): Effect of ethanol/trisodium citrate lock on microorganisms causing hemodialysis catheter-related infections. *J. Vasc. Access.* 8: 262–267.
- Tenke P., Kovacs B., Jäckel M., Nagy E.** (2006): The role of biofilm infection in urology. *World J. Urol.* 24: 13–20.
- Trautner B. W., Darouiche R. O.** (2004): Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention. *Arch. Intern. Med.*, 164: 842–850.
- Ude, S., Arnold, D. L., Moon, C. D., Timms-Wilson, T., Spiers A. J.** (2006): Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ. Microbiol.* 8: 1997–2011.
- Urbášková P.** (1998): Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody. TRIOS. Praha. 100 s.
- Vaca S., Arce J., Oliver G., Arenas D., Arguello F.** (1989): FIZ15 bacteriophage increases the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. *Rev. Lat. Am. Microbiol.* 31: 1–5.
- Van Delden C.** (2004): Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* In: Ramos J.L. [ed.]: *Pseudomonas*, Volume 2: Virulence and gene regulation. 3–22. Kluwer Academic. New York.
- Van Delden C., Iglewski B.** (1998): Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 551–560.
- Vávrová V.** [ed.] (2006): Mikrobiologie u pacientů s cystickou fibrózou. 115–119. In: Cystická fibróza. 1. vyd., Grada Publishing. Praha.
- Vávrová V., Zemková D., Skalická V., Pohunek P., Fila L., Smolíková L., Vaníček H., Polák J., Honomichl P., Bittenglová R., Holčíková A., Binková I., Zápalka M., Jakubec P.; Hubová J., Bišek J., Macek M.** (2008): Cystická fibróza v České republice. *Practicus.* 7: 17–21.
- Veesenmeyer J. L., Hauser A. R., Lisboa T., Rello J.** (2009): *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit. Care. Med.* 37: 1777–1786.
- Verstraeten N., Braeken K., Debkumari B., Fauvart M., Fransaeer J., Vermant J., Michiels J.** (2008): Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends. Microbiol.* 16: 496–506.
- Votava M.** (1999): Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii. Hortus. Brno. 407 p.
- Votava M.** (2005): Lékařská mikrobiologie obecná. 2. vyd., Neptun. Brno. 351 s.

- Walker S. T.** (1998): Microbiology. W.B. Saunders company. Philadelphia. 504 p.
- Wilson B. A., Salyers A. A., Whitt D. D., Winkler M. E.** (2010): Bacterial pathogenesis: A molecular approach. 3<sup>rd</sup> ed., ASM Press, Washington, 526 p.
- Wolfgang M. C., Jyot J., Goodman A. L., Ramphal R., Lory S.** (2004): *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 6664–6668.
- Woods D. E., Schaffer M. S., Rabin H. R., Campbell G. D., Sokol P. A.** (1986): Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. J. Clin. Microbiol. 24: 260–264.
- Yadav V., Harjai K., Kaur R., Joshi K., Sharma S.** (2004): Urovirulence of *Pseudomonas aeruginosa*: planktonic cells vs. biofilm cells. Folia Microbiol. 49: 465–470.
- Zolfaghar I., Evans D. J., Fleiszig S. M.** (2003): Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 71: 5389–5393.

# A PŘÍLOHY

## A.1 Původ kmenů

Kód	Poh.	Mat.	Pracoviště			Diagnóza
02AA	M	CK	FNUSA	I. CHK	JIP	onemocnění jícnu
08AB	M	CK	FNUSA	ARK	JIP	pneumothorax
13AC	Ž	MK	MOÚ	JIP	JIP	divertikulární nemoc střeva
22AA	Ž	MK	FNUSA	I. CHK	JIP	diabetes mellitus závislý na inzulinu
43AE	M	MK	FNUSA	I. NK	L	intacerebrální krvácení
46AC	M	MK	MOÚ	JIP	JIP	zánět tlustého střeva
64AC	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	mnohočetná onemocnění chlopní
67AE	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	endokarditida
81AD	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	endokarditida
85AB	M	CK	FNUSA	ARK	JIP	změny mízy, krvetvorby a příbuzných tkání
03BA	M	MK	FNUSA	I. NK	JIP	epilepsie
08BD	Ž	MK	FNUSA	II. CHK	L	ateroskleróza
11BC	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
17BA	Ž	CK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
21BC	M	MK	FNUSA	II. CHK	L	žlučové kameny
30BC	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
36BB	Ž	MK	FNUSA	II. CHK	L	komplikace výkonu jinde nezařazené
52BC	Ž	MK	FNUSA	I. CHK	JIP	nezhoubný novotvar trávicí soustavy
85BA	Ž	MK	FNUSA	II. CHK	L	ateroskleróza
96BC	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	výduř a disekce aorty
11CC	Ž	MK	FNUSA	II. CHK	L	ateroskleróza
12CC	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	nerevmatické onemocnění aortální chlopně
29CB	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
49CC	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	nerevmatické onemocnění aortální chlopně
55CC	Ž	MK	MOÚ	JIP	JIP	zhoubný novotvar hrtanu
57CE	M	MK	FNUSA	II. CHK	JIP	ateroskleróza
78CC	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	jiná specifická prohlídka a vyšetření bez obtíží
83CA	Ž	MK	FNUSA	I. NK	JIP	subarachnoidální krvácení
85CA	Ž	CK	CKTCH	Od. 12	JIP	revmatická vada dvojcípé chlopně
86CA	Ž	CK	MOÚ	JIP	JIP	zhoubný novotvar hrtanu
91CC	M	MK	FNUSA	I. NK	L	porucha mozku
01DA	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
16DF	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	nerevmatické onemocnění dvojcípé chlopně

(další)

Kód	Poh.	Mat.	Pracoviště			Diagnóza
35DB	M	MK	FNUSA	I. NK	JIP	mozkový infarkt
39DA	M	CK	CKTCH	Od. 13	JIP	výduř a disekce aorty
48DC	M	MK	FNUSA	I. NK	L	porucha mozku
55DA	M	MK	CKTCH	Od. 10	L	kardiomyopatie
40DC	Ž	MK	FNUSA	I. CHK	JIP	žaludeční vřed
72DA	M	CK	FNUSA	I. CHK	JIP	zhoubný novotvar jícnu
79DA	M	MK	FNUSA	I. NK	L	porucha mozku
09EA	Ž	MK	FNUSA	NCHK	JIP	nezhoubný novotvar mozkomíšních plen
33EA	M	CK	FNUSA	II. IK	L	mnohočetný myelom a plazmocytární novotvary
36EB	M	MK	FNUSA	I. NK	L	monocytická leukémie
67EB	M	MK	FNUSA	ARK	JIP	onemocnění dýchacích cest
82EB	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	žilní embolie a trombóza
88EB	M	MK	CKTCH	Od. 10	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
92EB	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	onemocnění jater
16FB	M	MK	FNUSA	II. CHK	L	onemocnění trávicí soustavy
25FC	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	nerevmatické onemocnění dvojčípé chlopně
34FC	M	MK	FNUSA	I. NK	L	jiná specifická prohlídka a vyšetření bez obtíží
51FD	Ž	MK	FNUSA	II. CHK	L	ateroskleróza
55FA	Ž	MK	FNUSA	I. NK	JIP	traumatický edém mozku
61FC	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	mnohočetná onemocnění chlopní
63FA	Ž	MK	FNUSA	I. NK	JIP	traumatický edém mozku
65FA	Ž	CK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
80FA	M	MK	MOÚ	KKOP	L	zhoubný novotvar varlete
91FA	M	CK	FNUSA	ARK	JIP	šok
21GC	M	MK	FNUSA	ARK	JIP	septikémie
29GB	M	MK	FNUSA	I. NK	JIP	jiná specifická prohlídka a vyšetření bez obtíží
32GA	M	MK	FNUSA	I. CHK	A	zbytnění prostaty
43GF	M	MK	FNUSA	II. CHK	JIP	dvanáctníkový vřed
50GA	M	MK	FNUSA	I. NK	JIP	mozkový infarkt
41GD	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	mnohočetná onemocnění chlopní
64GA	M	MK	FNUSA	I. NK	JIP	mozkový infarkt
76GB	M	MK	FNUSA	ARK	JIP	zánět pobřišnice
81GC	M	MK	NMB	I	JIP	chronické selhání ledvin
82GC	Ž	MK	NMB	I	L	Hodgkinova nemoc
95GA	M	MK	FNUSA	I. CHK	JIP	onemocnění žil
27HB	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	revmatická vada dvojčípé chlopně
50HB	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
65HA	Ž	CK	FNUSA	II. IK	JIP	akutní zánět slinivky břišní

(další)

Kód	Poh.	Mat.	Pracoviště			Diagnóza
25IA	M	MK	FNUSA	ARK	JIP	akutní zánět slinivky břišní
34IB	M	CK	FNUSA	I. CHK	JIP	absces plic a mediastina
35IA	M	MK	MOÚ	KKOP	L	zánět rekta
36IB	M	MK	MOÚ	KKOP	L	zánět rekta
57IA	Ž	MK	FNUSA	I. NK	JIP	jiná specifická prohlídka a vyšetření bez obtíží
61IC	Ž	MK	FNUSA	I. NK	JIP	otřes mozku
63IA	M	MK	FNUSA	ARK	JIP	akutní ischemické onemocnění srdeční
67IA	M	MK	FNUSA	II. CHK	L	jiná specifická prohlídka a vyšetření bez obtíží
96IC	Ž	MK	FNUSA	I. NK	L	onemocnění močové soustavy
14JC	Ž	MK	FNUSA	NCHK	JIP	mozkový infarkt
18JB	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	ischemická choroba srdeční
22JB	M	CK	FNUSA	NCHK	L	porucha autonomní nervové soustavy
63JA	Ž	MK	MOÚ	JIP	JIP	nezhoubný novotvar trávicí soustavy
67JB	M	MK	NMB	I	JIP	onemocnění mozku
73JD	M	MK	FNUSA	I. NK	JIP	mozkový infarkt
76JA	M	CK	MOÚ	JIP	JIP	zánět prostaty
76JB	M	CK	MOÚ	JIP	JIP	zánět prostaty
81JA	M	MK	CKTCH	KCH	JIP	endokarditida
03KC	M	MK	FNUSA	I. NK	JIP	mozkový infarkt
17KB	Ž	MK	FNUSA	I. NK	JIP	mozkový infarkt
22KB	Ž	MK	NMB	I	L	cévní příhoda mozku
29KB	Ž	MK	FNUSA	I. NK	JIP	mozkový infarkt
31KB	M	MK	FNUSA	II. CHK	L	komplikace výkonu jinde nezařazené
33KA	M	CK	MOÚ	JIP	JIP	zánět prostaty
90KB	M	MK	FNUSA	I. NK	JIP	porucha mozku
04LA	Ž	CK	FNUSA	I. CHK	JIP	onemocnění dýchacích cest
06LA	Ž	MK	NMB	I	L	dyspepsie
12LA	M	MK	FNUSA	I. NK	L	Parkinsonova nemoc
34LA	M	MK	FNUSA	NCHK	JIP	úrazové subdurální krvácení
42LB	Ž	MK	FNUSA	I. NK	L	intracerebrální krvácení
48LA	M	MK	FNUSA	I. NK	L	Parkinsonova nemoc
74LB	M	MK	FNUSA	I. IKK	JIP	zánět žil
76LA	Ž	MK	FNUSA	I. NK	L	Parkinsonova nemoc
81LA	M	MK	FNUSA	I. NK	JIP	mozkový infarkt
01MA	M	CK	MOÚ	KKOP	L	zánět rekta
04MA	M	MK	FNUSA	NCHK	L	onemocnění krčních meziobratlových plotének
12MA	Ž	MK	FNUSA	I. NK	L	jiná specifická prohlídka a vyšetření bez obtíží
32MB	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční

(další)

Kód	Poh.	Mat.	Pracoviště			Diagnóza
33MD	Ž	CK	MOÚ	I	L	příštěle postihující ženské pohlavní ústrojí
48MA	M	CK	FNUSA	I. IKK	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
50MA	M	MK	FNUSA	II. IK	JIP	chronické onemocnění ledvin
61MA	Ž	CK	MOÚ	U	L	novotvar močového orgánu
65MB	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
72MA	M	CK	CKTCH	Od. 13	JIP	jiná specifická prohlídka a vyšetření bez obtíží
77MA	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	nerevmatické onemocnění aortální chlopně
93MA	Ž	CK	CKTCH	Od. 12	JIP	nerevmatické onemocnění aortální chlopně
87MB	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
92MA	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	revmatická vada dvojcípé chlopně
96MA	M	MK	CKTCH	Od. 10	JIP	nerevmatické onemocnění dvojcípé chlopně
97MB	M	CK	CKTCH	Od. 13	JIP	nerevmatické onemocnění aortální chlopně
02NC	M	MK	FNUSA	I. IKK	L	fibrilace a flutter síní
16NA	M	CK	FNUSA	II. IK	L	zraněný cyklista
52NC	Ž	MK	MOÚ	G	L	zánět děložního hrdla
41ND	M	MK	FNUSA	I. NK	JIP	povrchní poranění hlavy
40NB	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
60NC	M	MK	FNUSA	ARK	JIP	respirační selhání nezařazené jinde
80NC	M	MK	FNUSA	II. CHK	JIP	ateroskleróza
86ND	M	MK	FNUSA	I. NK	JIP	mozkový infarkt
91NB	M	MK	FNUSA	NCHK	JIP	hydrocefalus
93NC	M	MK	FNUSA	NCHK	L	úrazové subdurální krvácení
95NB	M	CK	FNUSA	NCHK	JIP	hydrocefalus
25OA	Ž	MK	FNUSA	I. IKK	L	akutní zánět slinivky břišní
34OA	Ž	CK	CKTCH	Od. 13	JIP	nerevmatické onemocnění aortální chlopně
57OA	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	okluze a stenóza přívodných mozkových tepen nekončící mozkovým infarktem
63OA	Ž	MK	FNUSA	I. CHK	JIP	jiná specifická prohlídka a vyšetření bez obtíží
64OB	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	nerevmatické onemocnění aortální chlopně
74OA	M	CK	FNUSA	ARK	JIP	akutní zánět slinivky břišní
24PA	M	CK	FNUSA	NCHK	JIP	fokální poranění mozku
25PA	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
39PA	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
66PC	M	MK	MOÚ	JIP	JIP	zánět rekta
71PA	M	CK	FNUSA	I. NK	JIP	mozkový infarkt
79PA	M	CK	CKTCH	Od. 10	JIP	nerevmatické onemocnění aortální chlopně
02QC	M	MK	FNUSA	ARK	JIP	respirační selhání nezařazené jinde
40QC	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	komplikace po akutním infarktu myokardu

(další)



Kód	Poh.	Mat.	Pracoviště			Diagnóza
43QB	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
47QA	Ž	MK	CKTCH	Od. 12	JIP	mnohočetná onemocnění chlopní
61QC	Ž	MK	FNUSA	I. NK	JIP	porucha mozku
9QA	M	MK	FNUSA	I. IKK	JIP	jiná specifická prohlídka a vyšetření bez obtíží
70QA	M	CK	FNUSA	ORL	JIP	peritoneální absces
72QB	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
90QC	M	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	nerevmatické onemocnění aortální chlopně
91QE	M	MK	FNUSA	II. CHK	JIP	jiná specifická prohlídka a vyšetření bez obtíží
12RA	Ž	MK	FNUSA	I. NK	JIP	mozkový infarkt
22RA	M	MK	FNUSA	I. NK	L	porucha mozku
31RA	Ž	MK	NMB	I.	JIP	horečka neznámého původu
32RA	Ž	MK	FNUSA	I. NK	L	intracerebrální krvácení
33RC	M	MK	FNUSA	I. IKK	JIP	akutní infarkt myokardu
46RE	Ž	MK	FNUSA	I. IKK	L	zánět močového měchýře
70RA	M	CK	CKTCH	Od. 13	JIP	pacient s transplantovaným orgánem a tkání
94RE	M	MK	FNUSA	I. IKK	L	pneumonie způsobená potravou a zvratky
04SA	M	MK	FNUSA	I. CHK	JIP	neurčená mnohočetná poranění
08SB	M	MK	FNUSA	I. CHK	JIP	neurčená mnohočetná poranění
37SB	M	MK	CKTCH	Od. 14	JIP	pacient s transplantovaným orgánem a tkání
61SE	M	MK	FNUSA	ARK	JIP	akutní infarkt myokardu
63SB	M	CK	FNUSA	ARK	JIP	srdeční zástava
01TB	Ž	MK	FNUSA	I. NK	L	mozkový infarkt
14TC	M	MK	MOÚ	JIP	JIP	novotvar močového orgánu
63TB	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	výduř a disekce aorty
67TC	Ž	MK	CKTCH	Od. 13	JIP	chronická ischemická choroba srdeční
75TD	Ž	MK	FNUSA	II. CHK	L	ateroskleróza
79TA	Ž	CK	FNUSA	II. IK	JIP	chronické onemocnění ledvin
92TB	M	MK	CKTCH	Od. 10	JIP	nerevmatické onemocnění aortální chlopně

Legenda viz seznam zkratk.