

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Rok TOMAZIN

**MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA IZOLATOV  
BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa* BOLNIKOV S  
CISTIČNO FIBROZO**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Rok TOMAZIN

**MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA IZOLATOV BAKTERIJE  
*Pseudomonas aeruginosa* BOLNIKOV S CISTIČNO FIBROZO**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Pseudomonas aeruginosa*  
ISOLATES FROM PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Celotno raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Z mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Katja Seme, za somentorico asist. dr. Tjaša Cerar in za recenzentko prof. dr. Eva Ružić-Sabljić.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Somentorica: asist. dr. Tjaša Cerar, univ. dipl. mikr.

Recenzentka: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok, univ. dipl. biol.  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: asist. dr. Tjaša Cerar, univ. dipl. mikr.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Rok Tomazin

## KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

ŠD	Dn
DK	579.61.083+577.2.083:616-002.17(043)=163.6
KG	cistična fibroza/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /diagnostične metode/molekularne metode/dupleks PCR v realnem času/molekularna tipizacija/gelska elektroforeza v pulzirajočem polju/PFGE
AV	TOMAZIN, Rok
SA	SEME, Katja (mentorica)/CERAR, Tjaša (somentorica)/RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA IZOLATOV BAKTERIJE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BOLNIKOV S CISTIČNO FIBROZO
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 63 str., 18 pregl., 18 sl., 50 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Cistična fibroza je dedno pogojena bolezen, ki prizadene različne organske sisteme, predvsem dihala in prebavila. Vzrok drastičnega poslabšanja zdravstvenega stanja ter visoke smrtnosti bolnikov s to boleznijo je upadanje funkcije pljuč zaradi kronične okužbe z bakterijo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Sčasoma se v okuženih/koloniziranih dihalih razvijejo mutirani sevi z močno spremenjenim fenotipom, kar lahko oteži klasično identifikacijo, ki primarno temelji na fenotipskih lastnosti kulture. Zato ima pravilna identifikacija te bakterije ključno vlogo pri postavitvi uspešne terapije, ki lahko v končni fazi podaljša življenje bolnika. V raziskavi smo pripravili protokol za dupleks PCR v realnem času specifičen za gena <i>ecfX</i> in <i>gyrB</i> za identifikacijo fenotipsko neznačilnih izolatov <i>P. aeruginosa</i> . V analizo smo vključili 51 bakterijskih izolatov. Protokol odlikuje visoka specifičnost saj smo z njim v vseh primerih uspešno ločili med <i>P. aeruginosa</i> in njemu fenotipsko podobnimi bacili. V drugem delu diplomske naloge smo se lotili vprašanja dinamike okužb/kolonizacije pljuč bolnikov s cistično fibrozo s <i>P. aeruginosa</i> . Molekulska tipizacija 56 izolatov <i>P. aeruginosa</i> z gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju je pokazala, da več različnih sevov kolonizira enega bolnika, da se sevi lahko med kronično kolonizacijo periodično zamenjujejo, da se posamezni sevi med kolonizacijo razvijajo in, da lahko nekateri sevi kolonizirajo enega bolnika več mesecev.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	579.61.083+577.2.083:616-002.17(043)=163.6
CX	cystic fibrosis/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /diagnostic methods/molecular methods/duplex real-time PCR/molecular typing/pulsed-field gel electrophoresis/PFGE
AU	TOMAZIN, Rok
AA	SEME, Katja (supervisor)/CERAR, Tjaša (co-advisor)/RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2011
TI	MOLECULAR CHARACTERIZATION OF <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ISOLATES FROM PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XI, 63 p., 18 tab., 18 fig., 50 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>Cystic fibrosis is a hereditary disease that mostly affects the respiratory and the gastrointestinal tract. The main cause of high mortality and morbidity among cystic fibrosis patients is the rapid decline of the lung function caused by the chronic infection with hypermutable <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. In time, mutant strains with strong changes in the phenotype develop in the infected respiratory organs that can mislead the classical bacteriologic identification which is based on phenotypic characteristics of pure culture. Correct identification has a key role in determining a successful antibiotic therapy that can prolong the patient's life. In this study, we have prepared a duplex real-time PCR protocol specific for <i>ecfX</i> and <i>gyrB</i> genes for the identification of phenotypically atypical <i>P. aeruginosa</i> isolates. We have analysed 51 bacterial isolates. This protocol is highly specific, as we have correctly identified all <i>P. aeruginosa</i> isolates among the phenotypically very similar Gram-negative bacilli. In the second part of this graduation thesis, we have assessed the question of the lung infection/colonization dynamics. Molecular typing of 56 <i>P. aeruginosa</i> isolates by pulsed-field gel electrophoresis has shown that a number of different strains can colonize CF patients, that strains are periodically replaced during chronic colonization, that individual strains tend to evolve during carriage and that a given strain can be carried for months.</p>

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XI</b>
<b>1       UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1     NAMEN DELA.....	2
1.2     DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2       PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1     CISTIČNA FIBROZA .....	3
2.1.1   Beljakovina CFTR in njegova vloga v patofiziologiji cistične fibroze.....	3
2.1.2   Diagnostika cistične fibroze .....	6
2.2     BAKTERIJA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PRI BOLNIKIH S CISTIČNO FIBROZO .....	7
2.2.1   Bakterija <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
2.3     VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI .....	10
2.3.1   Verižna reakcija s polimerazo.....	10
2.3.1.1   Princip delovanja verižne reakcije s polimerazo .....	11
2.3.2   Verižna reakcija s polimerazo v realnem času .....	11
2.3.2.1   Zaznavanje produktov verižne reakcije s polimerazo .....	11
2.4     GELSKA ELEKROFOREZA V PULZIRajočEM POLJU .....	14

---

<b>2.4.1</b>	<b>Tipizacija in gelska elektroforeza v pulzirajočem polju kot tipizacijska metoda .....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>19</b>
3.1	MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ....	19
<b>3.1.1</b>	<b>Bakterijski izolati .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Bakteriološka gojišča .....</b>	<b>22</b>
3.1.2.1	Sestava gojišč .....	22
3.1.2.2	Priprava gojišč .....	24
<b>3.1.3</b>	<b>Verižna reakcija s polimerazo v realnem času specifičen za <i>P. aeruginosa</i>.....</b>	<b>25</b>
3.1.3.1	Ekstrakcija DNA .....	25
3.1.3.1.1	Ekstrakcija DNA s kuhanjem .....	25
3.1.3.2	Reakcijska mešanica .....	25
3.1.3.2.1	Predpriprava reakcijske mešanice .....	25
3.1.3.3	Pogoji pomnoževanja tarčne DNA in izvedba PCR v realnem času .....	26
3.2	MOLEKULARNA TIPIZACIJA BAKTERIJE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
<b>3.2.1</b>	<b>Bakterijski izolati .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Gelska elektroforeza v pulzirajočem polju .....</b>	<b>30</b>
3.2.2.1	Priprava bakterijske suspenzije in agaroznih kockic ter in situ osamitev genomske DNA .....	30
3.2.2.2	Restrikcija genomske DNA v agaroznih kockicah .....	31
3.2.2.3	Gelska elektroforeza v pulzirajočem polju .....	31
3.2.2.4	Barvanje in analiza agaroznega gela .....	32
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>33</b>
4.1	MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ....	33
<b>4.1.1</b>	<b>Rezultati verižne reakcije s polimerazo v realnem času po skupinah.....</b>	<b>34</b>

---

4.2	MOLEKULARNA TIPIZACIJA BAKTERIJE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	37
4.2.1	Izolati <i>Pseudomonas aeruginosa</i> osamljeni iz dihal bolnika A .....	40
4.2.2	Izolati <i>Pseudomonas aeruginosa</i> osamljeni iz dihal bolnika B .....	41
4.2.3	Izolati <i>Pseudomonas aeruginosa</i> osamljeni iz dihal bolnika C .....	42
4.2.4	Izolati <i>Pseudomonas aeruginosa</i> osamljeni iz dihal bolnika Č .....	43
4.2.5	Izolati <i>Pseudomonas aeruginosa</i> osamljeni iz dihal bolnika D .....	44
4.2.6	Izolati <i>Pseudomonas aeruginosa</i> osamljeni iz dihal bolnikov E in F .....	44
4.2.7	Izolati <i>Pseudomonas aeruginosa</i> osamljeni iz dihal bolnika G .....	46
4.2.8	Izolati <i>Pseudomonas aeruginosa</i> osamljeni iz dihal bolnikov H, I in J .....	46
4.2.9	Izolati <i>Pseudomonas aeruginosa</i> osamljeni iz dihal bolnikov, ki nimajo cistične fibroze .....	47
5	RAZPRAVA IN SKLEPI .....	49
5.1	IDENTIFIKACIJA BAKTERIJE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S PCR V REALNEM ČASU .....	49
5.1.1	Učinkovitost in specifičnost identifikacije z dupleks PCR v realnem času .....	49
5.2	MOLEKULARNA TIPIZACIJA BAKTERIJE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Z GELSKO ELEKTROFOREZO V PULZIRAJOČEM POLJU.....	51
5.3	SKLEPI .....	54
6	POVZETEK.....	55
7	VIRI .....	57

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Krvni agar.....	22
Preglednica 2: Hranilni agar (Oxoid CM3) za <i>Achromobacter xylosoxidans</i> .....	22
Preglednica 3: Gojišče za <i>Ralstonia pickettii</i> .....	23
Preglednica 4: Gojišče za <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	23
Preglednica 5: Tripton-sojin agar (Oxoid CM131) za <i>Inquilinus limosus</i> , <i>Ralstonia insidiosa</i> in <i>Ralstonia mannitolilytica</i> .....	23
Preglednica 6: Triptikazno-sojino tekoče gojišče (BBL 11768) za <i>Pandoraea apista</i> , <i>Pandoraea pnomenusa</i> , <i>Pandoraea pulmonicola</i> in <i>Pandoraea sputorum</i> .....	24
Preglednica 7: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidiv in hibridizacijskih sond.	26
Preglednica 8: Izolati osamljeni iz dihal bolnikov A, B in C.....	27
Preglednica 9: Izolati osamljeni iz dihal bolnikov Č, D in E.....	28
Preglednica 10: Izolati osamljeni iz dihal bolnikov F, G in H.....	28
Preglednica 11: Izolati osamljeni iz dihal bolnikov I, J in N .....	29
Preglednica 12: Tenoverjevi kriteriji za interpretacijo restrikcijskih vzorcev dobljenih s PFGE.....	32
Preglednica 13: Rezultati PCR-analize izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i> iz kužnin bolnikov s cistično fibrozo in treh referenčnih sevov. ....	34
Preglednica 14: Rezultati PCR-analize izolatov po Gramu negativnih, nefermentativnih bacilov fenotipsko podobnih <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	35
Preglednica 15: Rezultati PCR-analize izolatov <i>Pseudomonas fluorescens</i> iz pljuč bolnikov s cistično fibrozo. ....	36
Preglednica 16: Rezultati PCR-analize izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in <i>Pseudomonas fluorescens</i> iz okoljskih vzorcev. ....	36
Preglednica 17: Rezultati PCR-analize izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i> s sluznim fenotipom. ....	37
Preglednica 18: Število podtipov znotraj posameznega genotipa in njihove oznake ter razvrstitev po bolnikih s cistično fibrozo. ....	39

## KAZALO SLIK

Slika 1: : Membranski kanalček CFTR, sestavljen iz tandemse ponovitve ATP-vezajočega motiva (angl. ATP binding cassette, ABC), slednjega gradita transmembranski domeni MSD-1 in MSD-2 (angl. membrane spanning domain), vsaka sestavljena iz 6 transmembranskih struktur, ki se zaključijo z ATP-hidrolizirajočo strukturo NBD (angl. nucleotide binding domain), ponovitvi motiva sta ločeni z regulacijsko domeno R. Vezava in hidroliza ATP na NBD omogoča odpiranje in zapiranje kanalčka za Cl <sup>-</sup> (Lyczak in sod., 2002: 200).....	4
Slika 2: Primerjava stanja na respiratornem epiteliju v primeru zdravega epitelija in cistične fibroze (Lyczak in sod., 2002: 207). .....	6
Slika 3: Princip delovanja FRET-hibridizacijskih sond (Cockerill, 2003: 1117).....	13
Slika 4: Naprava za gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju (Herschleb in sod., 2007: 678).....	15
Slika 5: Prepoznavno mesto restriktaze SpeI. ....	31
Slika 6: Grafični prikaz rezultatov PCR v realnem času.....	33
Slika 7: Restrikcijski vzorec izolatov bolnika Č in D.. .....	38
Slika 8: Dendrogram in restrikcijski vzorec izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bolnika A. ....	40
Slika 9: Dendrogram in restrikcijski vzorec izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bolnika B. .....	41
Slika 10: Dendrogram in restrikcijski vzorec izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bolnika C. .....	42
Slika 11: Dendrogram in restrikcijski vzorci izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bolnika Č. .....	43
Slika 12: Dendrogram in restrikcijski vzorci izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bolnika D. ....	44
Slika 13: Dendrogram in restrikcijski vzorci izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bolnika F. ....	45
Slika 14: Dendrogram in restrikcijski vzorci izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bolnikov E in F. ....	45

---

Slika 15: Dendrogram in restrikcijski vzorec izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bolnika G.....	46
Slika 16: Dendrogram in restrikcijski vzorci izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bolnikov H, I in J.....	47
Slika 17: Dendrograma in restrikcijski vzorci izolatov bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bolnikov brez cistične fibroze in referenčnega seva <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853. ....	47
Slika 18: Skupno filogenetsko drevo izolatov <i>Pseudomonas aeruginosa</i> osamljenih iz dihal bolnikov A, B, C, Č, D, E, F, G, H, I in J s cistično fibrozo ter bolnikov, ki nimajo te dene bolezni.....	48

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$\mu\text{M}$	$\mu\text{mol/L}$
AX	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
BC	<i>Burkholderia cepacia</i>
BV	<i>Burkholderia vietnamensis</i>
CF	cistična fibroza
CFTR	transmembranski kloridni kanalček, angl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
DNA	deoksiribonukleinska kislina, angl. deoxyribonucleic acid
FAM	fluorescentno barvilo karboksifluorescein
IL	<i>Inquilinus limosus</i>
kbp	kilobazni par
MLST	tipizacija s sekvenciranjem več genskih lokusov, angl. multi locus sequence typing
P	<i>Pandoraea</i> sp.
<i>P.</i>	rod <i>Pseudomonas</i>
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAp	<i>Pandoraea apista</i>
PCR	verižna reakcija s polimerazo, angl. polymerase chain reaction
PF	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem polju, angl. pulsed-field gel electrophoresis
PP	<i>Pandoraea pulmonicola</i>
PPn	<i>Pandoraea pnomenusa</i>
PS	<i>Pandoraea sputorum</i>
RAPD	naključno pomnoževanje polimorfne DNA, angl. random amplification of polymorphic DNA
REP-PCR	<i>in vitro</i> pomnoževanje repetitivnih zaporedij, angl. repetitive-based sequence PCR
RI	<i>Ralstonia insidiosa</i>
RM	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>
RP	<i>Ralstonia pickettii</i>
rpm	obrati na minuto, angl. rounds per minute
SM	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
TxR	fluorescentno barvilo Texas red
UPGMA	neutežna metoda parnih skupin z aritmetično sredino, angl. unweighted pair group method with arithmetic mean



## 1 UVOD

Cistična fibroza (CF) je ena najpogostejših in najbolj poznanih dednih bolezni, ki prizadene različne organske sisteme, predvsem dihala, jetra in trebušno slinavko (Lyczak in sod., 2002; Farrell in sod., 2008). Klinični znaki so posledica mutacij gena *CFTR*, ki kodira beljakovino CFTR (angl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), slednja ima vlogo kloridnega kanalčka. Porušeno elektrolitsko ravnotežje predstavlja podlago za različne simptome te bolezni – motnje v absorpciji hrani, zaprtje prebavne cevi, sladkorna bolezen, kopičenje čvrste sluzi v pljučih in številne druge (Colin in Wohl, 1994). Povečana ionska jakost in viskoznost sluzi, ki prekriva različne sluznice, predvsem sluznico dihal, okrni njihove samočistilne in obrambne sposobnosti, kar ustvari odlične pogoje za razvoj bakterijskih okužb. V zgodnji fazи bolezni pride do kolonizacije oziroma okužbe dihal z bakterijami *Staphylococcus aureus* in *Haemophilus influenzae* (Burns in sod., 2001), kasneje v otroštvu se mladi bolniki srečajo z bakterijo *Pseudomonas aeruginosa*, ki je v primeru kronične okužbe glavni krivec za postopno hudo poslabšanje delovanja pljuč do te mere, da je včasih potrebna presaditev (Lyczak in sod., 2002; Emerson in sod., 2002). Pri preprečevanju, identifikaciji in zdravljenju okužb s *P. aeruginosa* naletimo na več problemov: (i) *P. aeruginosa* so ubikvitarni mikroorganizmi kar praktično onemogoči preprečitev stika z bakterijo, (ii) *P. aeruginosa* je naravno kompetentna, kar omogoči prevzem izven kromosomske DNA z informacijo o odpornosti proti antibiotikom in (iii) *P. aeruginosa* se na stresne razmere v dihalih, kot so na primer imunski odziv in antibiotiki, odzove tako s spremembou genske ekspresije kot tudi z mutacijami (Smith in sod., 2006), spremenjeni genotip se odraža tudi v spremenjenem fenotipu, kar močno oteži identifikacijo, ki pri *P. aeruginosa* temelji primarno na fenotipskih lastnostih (Lyczak in sod., 2002; Speert in sod., 1990). Spremenjen fenotip lahko vodi k napačni identifikaciji bakterije in neustreznem zdravljenju. V tem primeru, torej, ko imamo opravka s fenotipsko neznačilnimi izolati *P. aeruginosa*, nam pri pravilni identifikaciji lahko pomagajo visoko specifične identifikacijske metode, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo, PCR.

Iz epidemiološkega stališča nas zanima tudi dinamika okužb s *P. aeruginosa* in sorodstvena oziroma evolucijska povezanost izolatov osamljenih iz posameznih bolnikov

s CF. Odgovor na ta vprašanja dobimo s tipizacijo izolatov. Za *P. aeruginosa* obstajajo različne tipizacijske tehnike, ki temeljijo na fenotipskih značilnostih, ki so žal zaradi mutabilnosti in kompetence *P. aeruginosa* dokaj nezanesljive (Struelens in sod., 1993; Grundmann in sod., 1995). V zadnjih dveh desetletjih so se razvile številne molekularno-biološke metode, ki omogočajo bolj zanesljivo tipizacijo bakterijskih izolatov. Zlati standard molekularne tipizacije *P. aeruginosa* predstavlja gelska elektroforeza v pulzirajočem polju (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) (Tenover in sod., 1995; Kidd in sod., 2010).

### 1.1 NAMEN DELA

Želeli smo pripraviti PCR protokol za identifikacijo fenotipsko neznačilnih izolatov *P. aeruginosa* osamljenih v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani ter molekularno tipizirati izolate *P. aeruginosa* osamljene v letu 2010 iz dihal bolnikov s CF.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljam, da sta gena *gyrB* in *ecfX* bakterije *P. aeruginosa* genetsko dovolj stabilna in vrstno specifična, da ju lahko uporabimo kot tarčna gena za uspešno razločevanje med *P. aeruginosa* in ostalimi po Gramu negativnimi, nefermentativnimi, paličastimi bakterijami.

Predvidevamo tudi, da je večina bolnikov s CF okužena/kolonizirana z genotipsko unikatnim sevom ter, da kronično okužbo/kolonizacijo pri posameznem bolniku s CF povzroča en genotip bakterije *P. aeruginosa*.

## 2 PREGLED OBJAV

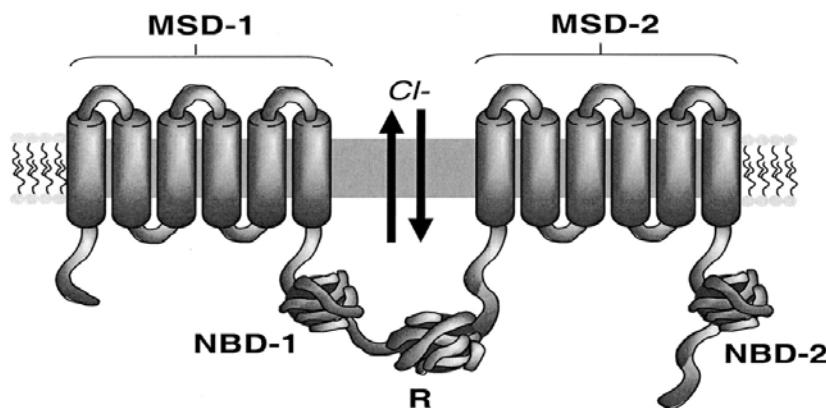
### 2.1 CISTIČNA FIBROZA

Cistična fibroza je avtosomno recessivna dedna bolezen in je ena najpogostejših in najbolj znanih dednih bolezni. Recessivni alel, ki je odgovoren za razvoj CF, nosi vsak petindvajseti človek (Colin in Wohl, 1994). Bolezen se kaže kot obolenje različnih organov, prizadeta so predvsem pljuča, jetra, trebušna slinavka in črevesje (Lyczak in sod., 2002).

CF je posledica mutacije gena *CFTR*, ki kodira membransko beljakovino CFTR (angl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Poznamo več kot 1500 različnih mutacij *CFTR*, ki se izražajo kot različne oblike iste bolezni – pri nekaterih bolnikih gre za blago obliko sinuzitisa, pri drugih je lahko močno prizadeta trebušna slinavka ali pljuča (Farrell in sod., 2008). Pomembno vlogo pri poteku CF imajo kronične okužbe dihal, predvsem okužbe s *P. aeruginosa*, ki so pri 80 % do 95 % bolnikov s CF glavni krivec za odpoved pljuč (Lyczak in sod., 2002; Emerson in sod., 2002)

#### 2.1.1 Beljakovina CFTR in njegova vloga v patofiziologiji cistične fibroze

Beljakovina CFTR je membranski kanalček, sestavljen iz 1480 aminokislinskih ostankov, ki ga uvrščamo v ABC (angl. ATP binding cassette) družino transporterjev (Wilschanski in sod., 1995). Sestavljen je iz tandemske ponovitve ABC motiva, slednjega gradi 6 transmembranskih struktur, ki se zaključijo z regijo, ki veže ATP, imenovano NBD (angl. nucleotide binding domain), ponovitvi motiva sta ločeni z regulacijsko domeno R (Slika 1). NBD lahko veže in hidrolizira ATP, kar omogoča odpiranje in zapiranje kanalčka za kloridne ione (Lyczak in sod., 2002). CFTR pa ne vpliva samo na prenos kloridnih ionov, posredno, preko regulacije, vpliva tudi na transport natrijevih, kalijevih in hidrogenkarbonatnih ionov (Lyczak in sod., 2002; Shumaker in sod., 1999).



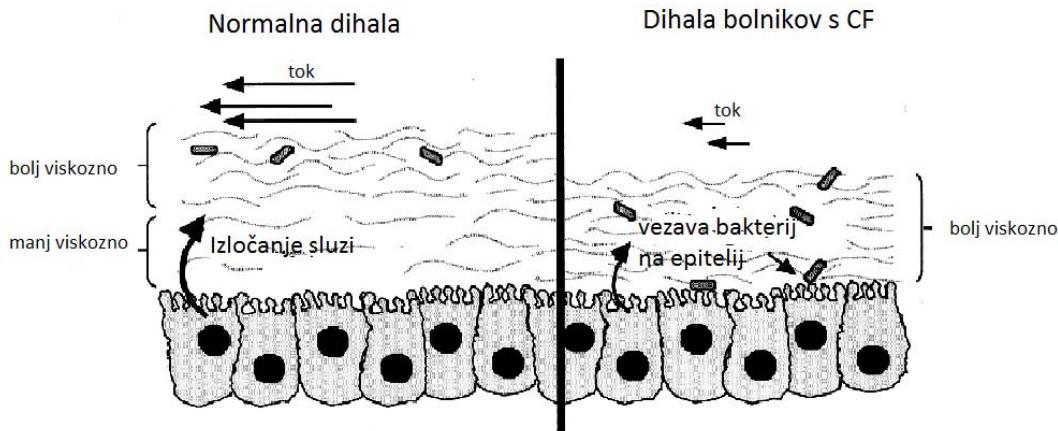
Slika 1: Membranski kanalček CFTR, sestavljen iz tandemske ponovitve ATP-vezajočega motiva (angl. ATP binding cassette, ABC), slednjega gradita transmembranski domeni MSD-1 in MSD-2 (angl. membrane spanning domain), vsaka sestavljena iz 6 transmembranskih struktur, ki se zaključijo z ATP-hidrolizirajočo strukturo NBD (angl. nucleotide binding domain), ponovitvi motiva sta ločeni z regulacijsko domeno R. Vezava in hidroliza ATP na NBD omogoča odpiranje in zapiranje kanalčka za  $\text{Cl}^-$  (Lyczak in sod., 2002: 200).

Informacija za sintezo CFTR je zapisana na kromosому 7, na genu *CFTR*, ki šteje okrog 250 kbp. Poznamo okrog 1500 različnih mutacij gena *CFTR* od tega jih več kot 200 povzroča simptomatski potek bolezni (Colin in Wohl, 1994). Ločimo 5 razredov mutacij tega gena, v razred I uvrščamo mutacije, ki predčasno prekinejo translacijo in s tem onemogočijo nastanek CFTR, v razred II spadajo mutacije, ki povzročijo nastanek nepravilno zgubanih CFTR, razred III sestavljajo mutacije, ki povzročijo sintezo CFTR, ki se ne odziva na cAMP, razred IV tvorijo mutacije, ki povzročijo slabšo regulacijsko aktivnost CFTR in v zadnji razred, razred V štejemo vse tiste mutacije, ki bodisi prekinejo translacijo bodisi onemogočijo optimalno post-translacijsko procesiranje (Wilschanski in sod., 1995). Najpogostejsa mutacija je delecija fenilalanina na mestu 508, ki je poznana pod oznako  $\Delta F508$  in predstavlja približno 70 % vseh mutiranih alelov (Lyczak in sod., 2002). Delecija fenilalanina na mestu 508 povzroči konformacijsko spremembo beljakovine CFTR in s tem njeno inaktivacijo (Legssyer in sod., 2006) kar jo uvrsti v II. razred mutacij *CFTR*.

Motnje v prenosu ionov na epitelijih in spremljajoče spremembe v viskoznosti izločkov predstavljajo osnovo kliničnim znakom CF (Slika 2). Motnje v delovanju trebušne slinavke povzročijo pomanjkanje določenih hidrolitičnih encimov, kar zmanjša zmognost absorpcije

hranil, predvsem maščob; prizadeti pankreas ne proizvaja inzulina, kar vodi v razvoj diabetesa, pojavi se mekonijski ileus – zastajanje blata zaradi zvečanja viskoznosti izločkov črevesnih žlez in pomanjkanja encimov trebušne slinavke, pojavi se lahko zlatenica zaradi obstrukcije jetrnih vodov, zaradi prekomerno izgube elektrolitov s potom pride v poletnih mesecih pogosto do hiponatremične dehidracije in metabolične alkaloze. Najbolj so prizadeta dihala, kjer pride do zastajanja čvrste, lepljive sluzi, ki oslabi aktivnost mukociliarne dvigalke (Colin in Wohl, 1994; Lyczak in sod., 2002) in ustvari ugodne razmere za razvoj bakterijskih okužb. Okvarjeni CFTR omogoči okužbe posredno s povečano ionsko jakostjo in viskoznostjo sluzi, ki oslabi samočistilne in obrambne mehanizme dihalnega epitelija. Na okužbo s *P. aeruginosa* ima tudi neposredni vpliv – služi namreč kot receptor za vezavo *P. aeruginosa* (Pier in sod., 1997). V pljučih zdravih ljudi je vloga CFTR poleg uravnavanja elektrolitskega ravnotežja tudi odstranjevanje bakterijskih celic iz dihalnega epitelija z endocitozo, vendar je za ta učinek potrebna veliko nižja koncentracija elektrolitov kot je značilna za dihala bolnikov s CF (Smith in sod., 1996; Pier in sod., 1997).

V zgodnji fazì bolezni lahko dokažemo okužbo z bakterijami *S. aureus* in *H. influenzae*. Ko bolezen napreduje, je prevladujoč vzrok okužb predvsem bakterija *P. aeruginosa*, ki predstavlja poseben problem za zdravljenje. Poleg omenjenih so za CF značilne tudi okužbe s *Stenotrophomonas maltophilia* in bakterijami iz kompleksa *Burkholderia cepacia* (Liou in sod., 2001).



Slika 2: Primerjava stanja na respiratornem epiteliju v primeru zdravega epitelija (levo) in cistične fibroze (desno). Epitelijske celice izločajo manj viskozno sluz, ki jo skupaj s tujki in nečistočami z mitgetalkami črpajo proti ustni votlini. V primeru cistične fobroze je zaradi višje koncentracije elektrolitov sluz viskoznejša kar ovira samočiščenje in samoobrambo epitelija (Lyczak in sod., 2002: 207).

### 2.1.2 Diagnostika cistične fibroze

Diagnoza je običajno postavljena na podlagi kliničnih znakov – kronični kašelj, produktivni kašelj, prisotnost nosnih polipov, nepravilnosti obnosnih sinusov, tipične bakterijske okužbe dihal, povišana koncentracija kloridnih ionov v potu, pankreatitis, ciroza jeter, zlatenica, hipoproteinemija, mekonijski ileus – in družinske zgodovine bolezni (Colin in Wohl, 1994; Farrell in sod., 2008). Zlati standard diagnostike CF je pilokarpinska ionoforeza s katero merimo koncentracijo kloridnih ionov v potu bolnika (Stern, 1997). Test je pozitiven, če se koncentracija  $\text{Cl}^-$  giblje med 60 in 79 mmol/L, za otroke veljajo nekoliko nižje vrednosti, 40 do 59 mmol/L. Pozitiven rezultat ionoforeze in določeni simptomi potrdijo diagnozo CF (Stern, 1997). Pri majhnem deležu homozigotov se pojavi atypična oblika CF, v tem primeru je za postavitev pravilne diagnoze potrebna genetska analiza. S komercialno dostopnimi molekularnimi testi lahko identificiramo 70 najpogostejših mutant *CFTR* (Lyczak in sod., 2002).

Zdravljenje CF je za enkrat simptomatsko. Uporablajo se bronhodilatorji, antiholinergiki, mukolitiki in DNAze, vitaminsko-mineralni prehranski dodatki, encimi, kortikostreoidi in nesteroidna protivnetra zdravila, antibiotiki, antimikotiki in še mnoga druga zdravila (Sawicki in sod., 2009).

## 2.2 BAKTERIJA *Pseudomonas aeruginosa* PRI BOLNIKIH S CISTIČNO FIBROZO

### 2.2.1 Bakterija *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterija *P. aeruginosa* je oportunistično patogena, po Gramu negativna, paličasta bakterija, ki jo uvrščamo v rod *Pseudomonas*, ki šteje okrog 200 vrst, družino *Pseudomonadaceae*, red *Pseudomonadales*, razred *Gamma-proteobacteria*, deblo *Proteobacteria* in domeno *Bacteria* (NCBI, 2011). *P. aeruginosa* so ubikvitarni bacili, ki jih najdemo skoraj povsod v naravi – v vodi, prsti, razpadajočem organskem materialu, so del prehodne mikrobiote kože – in v bolnišničnem okolju v hrani, vodi, opremi za dializo, cvetličnih šopkih, razkužilih, lijakih in straniščnih školjkah, tako rekoč povsod. Za *P. aeruginosa* je značilna striktno respiratorna presnova z glikolizo, ki poteka po Entner-Doudoroffovi poti. V aerobnih pogojih ima mesto terminalnega oksidanta v dihalni verigi kisik, v anaerobnih razmerah pa nitrati ali arginin (Murray in sod., 2009).

Kot omenjeno je *P. aeruginosa* oportunistično patogena bakterija, ki povzroča okužbe pri imunsko oslabelih osebah; znane so predvsem okužbe opeklín, sečil, zunanjega ušesa, oči in dihal. Okužbe spodnjih dihal se lahko kažejo kot asimptomatska kolonizacija, blaga oblika traheobronhitisa ali težko potekajoča pljučnica. Za kolonizacijo oziroma okužbo s *P. aeruginosa* so najbolj dojemljivi ljudje z nevtropenijo, CF ali drugimi kroničnimi boleznimi pljuč (Murray in sod., 2009). Patogeneza *P. aeruginosa* temelji na številnih virulentnih dejavnikih. Za vzpostavitev okužbe je najprej potrebna vezava z epitelijskimi celicami, ki je posredovana z bički, pili, lipopolisaharidom in alginatom (Murray in sod., 2009). V primeru CF se *P. aeruginosa* na epitelij veže tudi s pomočjo okvarjenih kanalčkov CFTR (Pier in sod., 1997). Eden najpomembnejših virulentnih dejavnikov je prav gotovo eksotoksin A, ki podobno kot difterijski toksin prepreči beljakovinsko sintezo. Med ostalimi toksini, ki jih biosintetizira *P. aeruginosa* najdemo tudi piocianin in

pioverdin, ki vežeta železo, stimulirata sproščanje vnetnih dejavnikov in reaktivnih zvrst kisika ter regulirata izločanje ostalih virulentnih faktorjev (Murray in sod., 2009), obenem sta tudi zaslužna za značilno obarvanost kolonij. *P. aeruginosa* producira tudi hidrolitične encime, ki poškodujejo epitelij. Tukaj imajo pomembno mesto elastazi LasA in LasB, ki katalizirata razgradnjo vezivnega tkiva ter fosfolipaza C, ki katalizira hidrolizo lecitina, glavnega fosfolipida evkariontskih organizmov (Murray in sod., 2009).

Večina izolatov *P. aeruginosa* ima tipične fenotipske lastnosti na podlagi katerih lahko to bakterijo brez težav identificiramo. Klasični izolati *P. aeruginosa* tvorijo po cvetličnem medu dišeče,  $\beta$ -hemolitične kolonije zeleno-rumene ali rdeče-rjave barve. Izolati *P. aeruginosa* osamljeni iz pljuč kronično okuženih bolnikov s CF imajo zelo drugačen fenotip, ki lahko zavede identifikacijo in s tem zdravljenje infekcije. Za te izolate je značilna izguba  $\beta$ -hemolitične aktivnosti, sinteze pigmentov piocianina, pioverdina in piorubina, izguba O-antigena ter hiperprodukcia alginata, nastanek avksotrofnih sluznih tipov in zmanjšana občutljivost za antibiotike (Speert in sod., 1990; Qin in sod., 2003; Anuj in sod., 2009). Vse te morfološko-fiziološke spremembe so posledica odziva *P. aeruginosa* na razmere v pljučih bolnikov s CF z uravnavanjem izražanja genov in predvsem z mutagenezo (Smith in sod., 2006). Bolniki s CF se s *P. aeruginosa* okužijo v otroštvu, najverjetneje v prvih 3 letih življenja, drugače pa v 70 do 80 % do 10 rojstnega dne (Burns in sod., 2001). Za zgodnjo, akutno stopnjo okužbe je značilno, da so izolati *P. aeruginosa* genotipsko in fenotipsko zelo podobni izolatom različnih ekoloških niš okolja, na primer prsti, jezer, rastlin. Identifikacija in eradicacija teh sevov *P. aeruginosa* je relativno enostavna. Bakterije identificiramo s pomočjo gojitvenih in biokemijskih metod medtem, ko z uporabo agresivne protimikrobne terapije odpravimo okužbo in preprečimo oziroma zapoznimo razvoj kronične oblike okužbe (Jelsbak in sod., 2007). Razmere v pljučih bolnikov s CF vzpostavijo močan selekcijski pritisk, ki omogoči preživetje in vzpostavitev kronične oblike okužbe le najbolj prilagojenim sevom. V kronični fazи iz pljuč osamimo izolate, ki pripadajo bodisi enemu sevu bodisi več koeksistirajočim sevom, mogoča je tudi periodična zamenjava sevov (Struelens in sod., 1993). Kot že omenjeno se *P. aeruginosa* na selekcijski pritisk odzove z mutacijami nekaterih genov. Te mutacije, ki večinoma povzročijo utišanje neke aktivnosti, omogočajo bakteriji, da vzpostavi dolgotrajno okužbo (Smith in sod., 2006). Ena izmed najbolj znanih prilagoditev je

nastanek sluznih tipov, ki so karakteristični za kronično stopnjo okužbe. Sluzni ovoj, ki obdaja bakterijske celice sestavlja alginat, acetiliran polimer iz manuronske in guluronske kisline (Lyczak in sod., 2002). Alginat predstavlja osnovno ogrodje biofilma ter varuje bakterije pred imunskim odzivom gostitelja in antibiotiki, namreč onemogoči aktivacijo komplementnega sistema, prepreči kemotakso fagocitnih celic, nevtralizira hipohalidne kisline in upočasni difuzijo zdravil ali jih celo veže na svoji površini (Schurr in sod., 1994; Lyczak in sod., 2002; Carmen in sod., 2004; Mulet in sod., 2009). Zunaj pljuč bolnikov s CF ima *P. aeruginosa* aktiven protein MucA, ki inhibira dejavnik  $\sigma^E$ , ki je potreben za intenzivno biosintezo alginata, torej okoljski sevi in izolati v zgodnjih stopnjah okužbe nimajo sluznega fenotipa in ne tvorijo biofilmov. Za kronične okužbe so značilni izolati, ki imajo inaktiviran gen *mucA*, kar povzroči hiperprodukcijo alginata (Feliziani in sod., 2010). Mutacija povzroči prezgodnjo prekinitev translacije, najpogosteje se pojavlja mutacija imenovana *mucA22* (Schurr in sod., 1994). Mutacijo *mucA* v *mucA22* in s tem pojav sluznega fenotipa najverjetneje sprožijo reaktivne zvrsti kisika, ki jih sproščajo nevtrofilci (Mathee in sod., 1999). Izolati *P. aeruginosa* osamljeni iz kronično okuženih bolnikov so v večini primerov bolj odporni proti antibiotikom. Problem predstavlja tudi dejstvo, da antibiotiki, ki so učinkoviti *in vitro* niso učinkoviti *in vivo*. *P. aeruginosa* je razvil različne mehanizme odpornosti proti antibiotikom – črpalki za črpanje protimikrobnih snovi iz celice, kemično spreminjanje tarčnih mest in sprejem plazmidne DNA (Mulcahy in sod., 2010). Eden bolje preučenih mehanizmov zmanjšanja antibiotične občutljivosti je aktivacija črpalk MexXY-OprM, ki povzroči odpornost proti aminoglikozidnim antibiotikom amikacinu, gentamicinu in tobramicinu (Smith in sod., 2006). Za aktivacijo MexXY-OprM je potrebna mutacija gena *mexZ*, ki kodira negativni regulator te črpalk (Feliziani in sod., 2010). Pomembne so tudi mutacije genov *lasR*, ki je vključen v regulacijo zaznavanja celične gostote (angl. quorum-sensing) in s tem v regulacijo izražanja nekaterih virulentnih dejavnikov, *exsA*, ki nadzira delovanje izločevalnega sistema tipa III ter genov *mutL* in *mutS*, ki povečajo mutabilnost bakterije z inaktivacijo DNA-popravljalnih mehanizmov (Smith in sod., 2006; Feliziani in sod., 2010).

Vse morfološko-fiziološke spremembe so prilagoditve na zelo specifične razmere v pljučih, ki se od bolnika do bolnika tako razlikujejo, da v nekaterih primerih ne morejo

kolonizirati dihal drugih bolnikov, v evolucijskem smislu so taki sluzni tipi slepe ulice (Jelsbak in sod., 2007). Glavni vzrok tega zelo učinkovitega prilagajanja stresnim razmeram je hipermutabilnost bakterije, ki temelji na točkovnih mutacijah in predvsem na intra- in interspecijskih horizontalnih prenosih DNA (Pirnay in sod., 2009). Genom *P. aeruginosa* je torej sestavljen iz zelo ohranjenega jedra in mobilnih genetskih elementov, ki se prenašajo večinoma s pomočjo bakteriofagov (Pirnay in sod., 2009). Poleg okužb iz okolja obstajajo tudi primeri, ki nakazujejo na možnost prenosa *P. aeruginosa* med bolniki s CF (McCallum in sod., 2001; Armstrong in sod., 2003; Jelsbak in sod., 2007; Fothergill in sod., 2010). Vsekakor je tak prenos mogoč, predvsem, če gre za seve značilne za zgodnje faze kolonizacije, ki imajo aktivne vse mehanizme patogeneze. Pljučni epitelij lahko na novo kolonizirajo tudi sevi značilni za kronične okužbe, predvsem *mucA* revertante, torej ne-sluzni sevi (Jelsbak in sod., 2007). Kljub prenosu med bolniki in dokazu sorodnih sevov pri različnih bolnikih ne gre za CF-specifične klonske linije ampak za sorodne seve prilagojene na zelo podobno mikrookolje (Pirnay in sod., 2009; van Mansfeld in sod., 2010). Specifičnih klonskih linij za specifično okolje ali klinično stanje za enkrat ne poznamo (Pirnay in sod., 2009).

## 2.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI

### 2.3.1 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) je metoda hitrega pomnoževanja nukleinskih kislin *in vitro* (Herzog-Velikonja in Gruden, 2008), ki je revolucionizirala biološke in biokemijske znanosti. S PCR smo sposobni pomnožiti zelo majhne količine DNA ali RNA do te mere, da lahko z njimi manipuliramo – analiziramo nukleinsko kislino, dokažemo prisotnost nekega organizma, pomnožke uporabimo v biotehnološke namene in tako naprej.

Princip delovanja verižne reakcije s polimerazo

Za vsako PCR reakcijo potrebujemo matrično DNA, vse deoksiribonukleozid-trifosfate (dNTP), DNA-polimerazo, ustrezen pufer, par začetnih oligonukleotidov in sterilno destilirano vodo (Žgur-Bertok in Starčič-Erjavec, 2009). Prva stopnja reakcije verižne polimerizacije je denaturacija matrične DNA pri temperaturi 94 do 98 °C, odvisno od nukleotidne sestave DNA in traja približno 30 s, sledi prileganje začetnih oligonukleotidov pri 5 °C nižji temperaturi od talilne temperature, prileganje traja približno 30 s. Sledi sinteza DNA, ki jo katalizira DNA-polimeraza pri optimalni temperaturi katalize, le-ta običajno znaša med 72 in 80 °C. Celotni cikel ponovimo 30- do 40-krat kar traja 1 do 2 uri (Cockerill, 2003; Žgur-Bertok in Starčič-Erjavec, 2009). V primeru klasičnega PCR pomnožke detektiramo z elektroforezo na agaroznem gelu, za specifično identifikacijo je potrebno izvesti še hibridizacijo po Southernu (Cockerill, 2003).

### 2.3.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

PCR v realnem času istočasno združuje klasično tehnologijo *in vitro* pomnoževanja DNA in spektrofotometrično detekcijo PCR-pomnožkov (Espy in sod., 2006). Pomnoževanje in detekcija produktov potekata v isti napravi, kar močno zmanjša možnost (nenamernega) prenosa pomnožene DNA v okolje in kontaminacijo sledečih PCR reakcij. Pozitivna stran PCR v realnem času je tudi visoka občutljivost in specifičnost enakovredna kombinaciji klasičnega PCR in Southern-blota (Espy in sod., 2006). Z izvedbo PCR v realnem času imamo manj dela in porabimo manj časa v primerjavi s klasičnim PCR in sledečo analizo pomnožkov z gelsko elektroforezo (Cockerill, 2003).

Zaznavanje produktov verižne reakcije s polimerazo

Zaznavanje produktov PCR temelji na zaznavanju fluorescence – v reakcijsko zmes so vključena bodisi fluorescentna barvila bodisi fluorescentno označene oligonukleotidne sonde. Najbolj enostavna in najmanj specifično detekcijo omogoča uporaba fluorescentnih barvil, predvsem SYBR Green. Metoda je z uporabo barvila SYBR Green visoko občutljiva, vendar je specifičnost identifikacije pomnožkov podobna tisti v primeru

uporabe agarozne elektroforeze (Espy in sod., 2006). Zaradi nizke specifičnosti so razvili tako imenovano tehnologijo sond, ki močno zveča specifičnost detekcije saj gre za povezovanje komplementarnih nukleotidnih sekvenc sonde in tarčne DNA. Ločimo 3 tipe detekcije s pomočjo hibridizacijskih sond, ki temeljijo na prenosu svetlobne energije med dvema fluorescentnima barviloma:

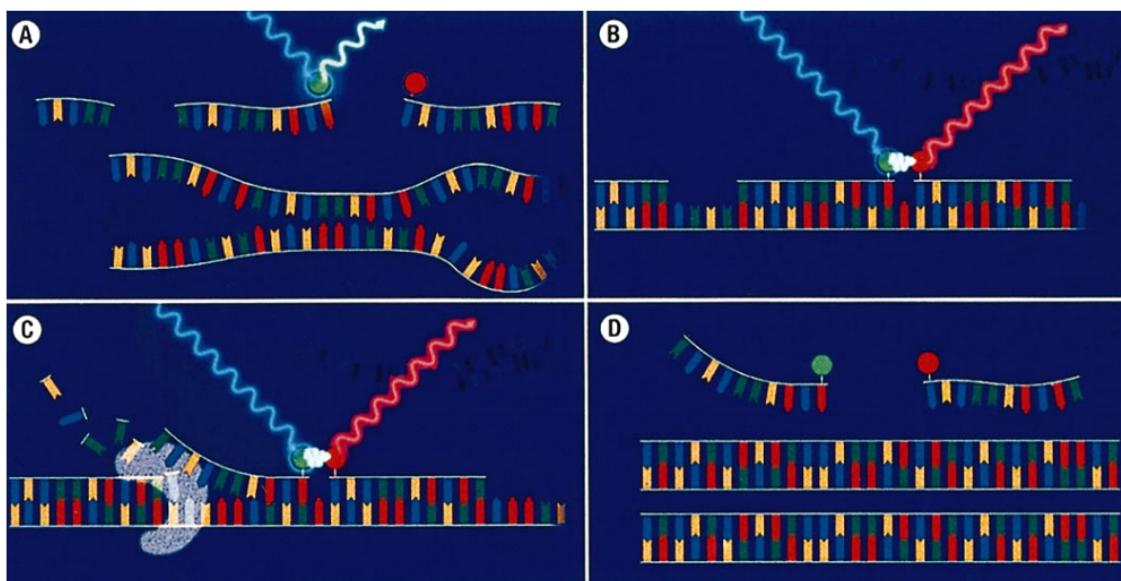
1. 5'-nukleazne sonde imenovane tudi TaqMan sonde
2. Molekularni svetilniki
3. FRET-hibridizacijske sonde

TaqMan sonde sestavlja kratko nukleotidno zaporedje, ki nosi na 5'-koncu fluorescentno barvilo, na 3'-koncu pa utiševalce (angl. quencher) fluorokroma. Za pojav fluorescence je potrebna ločitev fluorokroma od utiševalca, to nalogi izvrši Taq-polimeraza s svojo 5'-nukleazno aktivnostjo. Ko se fluorescentno barvilo loči od utiševalca lahko zaznamo porast fluorescence. Prednost TaqMan sond je v tem, da lahko zaznavamo fluorescenco v vseh stopnjah *in vitro* pomnoževanja DNA (Cockerill, 2003; Espy in sod., 2006).

Molekularni svetilniki delujejo podobno kot TaqMan sonde le, da ni potrebna 5'-nukleazna aktivnost. Tudi te sonde imajo na 5'-koncu vezan fluorokrom in na 3'-koncu utiševalce, blizu vsakega konca je locirana komplementarna regija, ki povzroči nastanek zankaste sekundarne strukture. Med temi regijama se nahaja sekvenca komplementarna tarčni DNA, ob specifični vezavi molekulskega svetilnika se barvili ločita in povzročita fluorescenco. Žal jo lahko merimo le med hibridacijsko stopnjo PCR (Cockerill, 2003; Espy in sod., 2006).

Zadnji tip nukleotidnih sond predstavljajo FRET-hibridizacijske sonde, ki so poznane tudi pod imenom LightCycler sonde (Slika 3). Ta tip sond smo uporabili tudi v diplomski nalogi. V bistvu gre za dve sondi, ki se na PCR-pomnožek vežeta ena za drugo. Na 3'-koncu prve sonde je vezano fluorescentno barvilo, na 5'-koncu druge sonde pa akceptorsko barvilo. Vzbujeno 3'-fluorescentno barvilo prenese energijo na 5'-akceptorsko barvilo, ki nato odda fluorescentno svetlobo. Če se sondi ne vežeta specifično na PCR-pomnožek sta preveč oddaljeni, da bi prišlo do energijskega prenosa in posledično do fluorescence. Tudi v tem primeru lahko merimo fluorescenco le med hibridacijsko stopnjo PCR (Cockerill,

2003; Espy in sod., 2006). FRET je kratica za fluorescentna resonanca energijskega transferja.



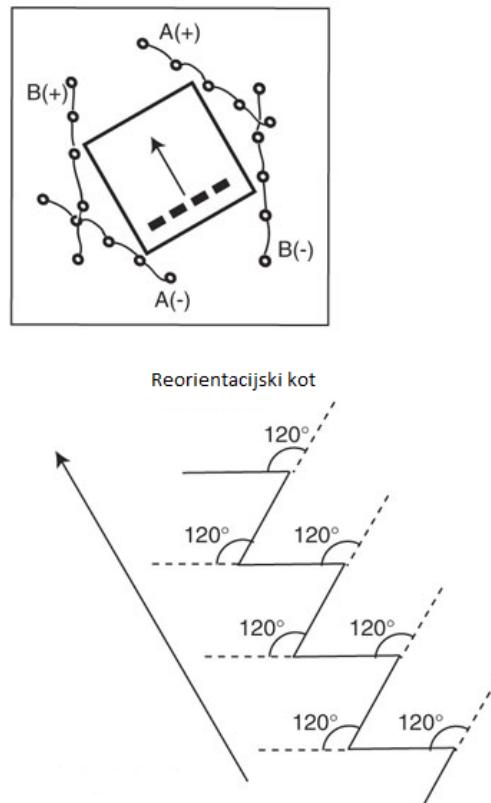
Slika 3: Princip delovanja FRET-hibridizacijskih sond. A) Pred specifično vezavo na tarčno zaporedje sta sondi preveč oddaljeni, da bi prišlo do prenosa energije iz 3'-barvila na 5'-akceptorsko barvilo. B) S specifično vezavo sond na tarčno zaporedje se energija vzbujenega 3'-fluoresceina prenese na 5'-akceptorsko barvilo, ki začne oddajati svetlobo večje valovne dolžine, ki jo zazna fotosenzor. C) DNA-polimeraza odstrani in s tem loči sondi kar prekine oddajanje fluorescenčnega signala (D) (Cockerill, 2003: 1117).

PCR v realnem času je zaradi visoke specifičnosti, relativno kratke in enostavne izvedbe zelo mikavna molekularno-biološka metoda, ki omogoča zanesljivo identifikacijo različnih bakterij, virusov, gliv in praživali (Cockerill, 2003; Espy in sod., 2006). Kot posebej primerna se je izkazala pri identifikaciji fenotipsko neznačilnih izolatov *P. aeruginosa*. Za tarčna mesta so uporabili gene *oprL*, *oprI*, *algD*, *toxA*, *groES* in gen za 16S rRNA, vendar se niso najbolje obnesli, bakterija *P. aeruginosa* je namreč močno podvržena mutacijam kar ima za posledico gensko nestabilnost. Tako se je izkazalo, da nukleotidno zaporedje *algD* in *toxA* precej variira ter, da imajo horizontalni prenos DNA močan vpliv na *oprL*, *oprI* in 16S rDNA (Qin in sod., 2003; Lavenir in sod., 2007). Iz teh razlogov je smiselna uporaba dveh tarčnih genov, kar zmanjša število lažno negativnih rezultatov ozziroma zveča

specifičnost PCR (Anuj in sod., 2009). Kot uspešna se je izkazala kombinacija genov *ecfX* in *gyrB*. Gen *gyrB* kodira podenoto B DNA-giraze, *ecfX* pa zunajcitoplazmatski sigma-dejavnik, ki sodeluje pri izražanju virulentnih dejavnikov (Anuj in sod., 2009).

## 2.4 GELSKA ELEKROFOREZA V PULZIRAJOČEM POLJU

PFGE je molekularno-biološka metoda namenjena ločevanju velikih molekul DNA (Herschleb in sod., 2007). Klasična elektroforeza na agaroznem gelu je ena najpogosteje uporabljenih in najenostavnnejših molekularno-bioloških tehnik analize nukleinskih kislin. Temelji na dejstvu, da je DNA negativno nabita molekula in posledično potuje v agaroznem gelu proti pozitivno nabiti elektrodi v odvisnosti od njene velikosti – večje molekule DNA potujejo počasneje kot manjše. S klasično gelsko elektroforezo lahko med seboj ločimo molekule do velikostnega razreda 50 kb, če uporabimo zelo redke gele in nizek električni tok lahko ločimo tudi do 200 kb velike DNA-molekule (Herschleb in sod., 2007). Žal to ne omogoča ločevanja celih kromosomov ali velikih restriktijskih fragmentov. Problem reši PFGE, ki s periodičnimi spremembami smeri električnega toka omogoča ločevanje tudi do 10 Mb velikih molekul. Med elektroforezo potujejo molekule DNA skozi pore v agaroznem gelu. Manjše molekule potujejo brez problemov, večje molekule se pa pogosto nahajajo v obliki klopčičem podobnih struktur, ki so prevelike za pore v gelu, za potovanje je potreben razplet te prepletene strukture in prevzem popolne orientacije v električnem polju. To težavo razreši spreminjanje smeri električnega toka v natančno določenih časovnih intervalih (Slika 4), ki omogočijo popolno orientiranost v polju in s tem potovanje velikih fragmentov. DNA se na spremembo smeri toka odzove s spremembo orientacije, manjše molekule se odzovejo v krajšem času kot večje kar povzroči hitrejšo prilagoditev orientacije na polje in s tem večjo hitrost gibanja po gelu (Herschleb in sod., 2007).



Slika 4: Naprava za gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju. Puščica kaže smer gibanja DNA, polne črte prikazujejo dejansko pot DNA-molekul, črtkane črte pa predstavljajo tirkice, ki jih je ustvarilo električno polje (Herschleb in sod., 2007: 678).

#### 2.4.1 Tipizacija in gelska elektroforeza v pulzirajočem polju kot tipizacijska metoda

Tipizacija je proces ugotavljanja podobnosti oziroma sorodnosti med bakterijskimi izolati (Tenover in sod., 1995). S tipizacijo poskušamo ugotoviti vir okužbe, pot prenosa mikroorganizmov, iščemo seve z večjo možnostjo prenosa ter proučujemo strukturo in dinamiko mikrobne populacije (van Belkum in sod., 2007). Dobre tipizacijske metode morajo imeti visoko ločljivost in ponovljivost, metoda mora biti sposobna epidemiološko opredeliti vsak izolat, z dobro metodo lahko tipiziramo širok spekter mikrobnih vrst z minimalnimi spremembami izvedbe, dobri lastnosti sta tudi hitrost ter dostopnost reagentov in naprav (Tenover in sod., 1995; van Belkum in sod., 2007). Za enkrat nobena tipizacijska metoda ne zadovolji vseh kriterijev. Tipizacija bakterij je sprva temeljila na fenotipskih lastnostih, razvili so različne metode kot so fagotipizacija, ki se uporablja za

tipizacijo bakterij *Staphylococcus aureus* in *Listeria monocytogenes*, serotipizacija za razločevanje *Salmonella enterica* in *Escherichia coli* in biokemijska tipizacija za razločevanje znotraj vrst različnih po Gramu negativnih bakterij (van Belkum in sod., 2007). Večina teh fenotipizacijskih metod je bila razvita za tipizacijo določenih bakterijskih vrst in zato na žalost teh metod ne moremo uporabiti za tipizacijo katerekoli bakterijske vrste. Fenotipske značilnosti, ki predstavljajo temelj fenotipizacije so v evolucijskem smislu nestabilne, saj se lahko nekatere med njimi prenašajo znotraj iste vrste ali celo med zazličnimi vrstami in se izražajo glede na bolj ali manj specifične razmere v okolju. Torej, fenotipske lastnosti ne odražajo evolucijske povezanosti med izolati in so zatorej neustrezne za proučevanje strukture in dinamike bakterijske populacije, to še posebej velja za fenotipsko nestabilne bakterije kot je *P. aeruginosa*. Z uporabo genotipizacijskih metod, ki temeljijo na genetskih zančilnostih izolatov lahko tipiziramo širši spekter bakterijskih vrst in natančneje opredelimo filogenetsko oziroma sorodstveno povezanost izolatov. V zadnjih dveh desetletjih so se razvile številne molekularno-biološke tipizacijske metode, ki temeljijo na hibridizaciji, *in vitro* pomnoževanju nukleinskih kislin, restrikciji genomske DNA in slediči gelski elektroforezi ter na ugotavljanju nukleotidnega zaporedja (van Belkum in sod., 2007).

PFGE je nadvse primerna metoda za analizo velikih molekul DNA, tako kromosomov kot večjih fragmentov, ter trenutno predstavlja zlati standard genotipizacije bakterij (Tenover in sod., 1995; Kidd in sod., 2010). V tipizacijske namene ne uporabljam intaktne kromosomske DNA kot pri analizi umetnih kromosomov bakterij in gliv kvasovk, ampak fragmente kromosomov dobljene po predhodni restrikciji z izbrano restrikcijsko endonukleazo. Ugotavljanje genotipov s pomočjo PFGE temelji na spoznanju, da kromosomska DNA ni statična ampak podvržena različnim genetskim procesom kot na primer transpoziciji in točkovnim mutacijam, kar povzroči spremembe v nukleotidnem zaporedju ter s tem spremembe v poziciji in številu restrikcijskih mest, torej tarčnih mest za restriktaze. Vsaka sprememba genoma, ki se kaže kot sprememba restrikcijskega mesta se pokaže kot spremenjen, drugačen makrorestrikcijski vzorec. Točkovne mutacije lahko povzročijo bodisi nastanek novega restrikcijskega mesta bodisi izgubo že obstoječega restrikcijskega mesta. V prvem primeru ima restrikcijski vzorec na mestu izvornega fragmenta dva manjša fragmenta, v drugem primeru pa opazimo nov, večji fragment in

odsotnost dveh izvornih manjših fragmentov. Vstavitev DNA v obstoječe restriktijsko mesto ne spremeni števila fragmentov – fragment z insercijo DNA ima večjo molsko maso in s tem višjo pozicijo na gelu kot izvorni fragment. Delecija DNA med restriktijskima mestoma povzroči izgubo večjega fragmenta in posledično pridobitev novega, manjšega fragmenta (Tenover in sod., 1995).

Poleg PFGE so raziskovalci razvili še druge molekularno-biološke metode, ki omogočajo genotipizacijo mikrobov: RFLP, RAPD, REP-PCR, SNP in MLST (Speert, 2002). Med vsemi je PFGE najbolj preverjena in edina metoda, ki ima izoblikovano tudi interpretacijo rezultatov s katero lahko uvrstimo izolate v štiri skupine glede na število različnih fragmentov (Tenover in sod., 1995). Interpretacija teh kriterijev je zanesljiva, če dobimo na gelu jasno lečenih vsaj 10 fragmentov.

Do nedavnega so rezultate PFGE interpretirali samo s pomočjo Tenoverjevih kriterijev, ki uvrstijo pulzotipe v štiri skupine glede na število in položaj restriktijskih fragmentov (Tenover in sod., 1995). Ti kriteriji so namenjeni karakterizaciji izolatov osamljenih v kratkem časovnem obdobju 1 do 3 mesecev in zato niso najbolj ustrezni za analizo strukture populacije *P. aeruginosa* osamljenih iz kronično okuženih/koloniziranih bolnikov s CF (Tenover in sod., 1995; Fothergill in sod., 2010). Poleg tega lahko konstantne subkulтивacije bakterije in večkratne osamitve iz istega bolnika povzročijo spremembe v restriktijskem vzorcu, kar zavede interpretacijo in s tem uvrstitev v ustrezno epidemiološko skupino (Tenover in sod., 1995). Poleg Tenoverjevih kriterijev se vedno bolj uporabljajo metode filogenetske analize. Rezultat slednje je filogenetsko drevo, dendrogram, ki shematsko prikaže evolucijske oziroma sorodstvene odnose med proučevanimi organizmi. Za rekonstrukcijo dendrograma se uporabljajo različne metode, mi smo si izbrali neutrežno metodo parnih skupin z aritmetično sredino (angl. unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA), ki je ena najpreprostejših metod rekonstrukcije filogenije. UPGMA se uporablja tako za rekonstrukcijo dendrogramov, ki odslikujejo fenotipsko podobnost kot za molekularno filogenijo, vendar le v primeru, če je hitrost evolucije na molekularnem nivoju med posameznimi linijami približno enaka – to je osnovna predpostavka, ki pa v realnosti običajno ne velja. Pri UPGMA-metodi najprej ugotovimo kateri dve skupini ali organizma sta si najmanj različna, v našem primeru, da imata največ isto ležečih pasov. Ta dva organizma/izolata nadalje obravnavamo kot celoto,

kot novo taksonomsko enoto. Nato postopek ponavljamo dokler ne dobimo filogenetskega drevesa (Jerman in Štern, 1999). Nam je delo močno olajšal računalniški program GelCompar II 6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgija), ki je na osnovi podobnosti vnesenih makrorestriktičskih vzorcev rekonstruiral filogenetske odnose med izolati *P. aeruginosa* osamljenih iz pljuč bolnikov s CF.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa*

##### 3.1.1 Bakterijski izolati

V analizo smo vključili 51 izolatov bakterij iz rodov *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Inquilinus*, *Pandoraea*, *Ralstonia* in *Stenotrophomonas*. Vir vseh izolatov je bila zbirka bakterijskih izolatov Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Vsi izolati so bili predhodno identificirani s fenotipskimi in/ali molekularno-biološkimi metodami (sekvenciranje 16S rDNA). Izolate smo razdelili na 5 skupin glede na njihove fenotipske lastnosti in izvor ter vsakemu izolatu dodelili oznako PA za *P. aeruginosa*, P za *Pandoraea* sp., AX za *Achromobacter xylosoxidans*, BC za *Burkholderia cepacia*, BV za *Burkholderia vietnamensis*, IL za *Inquilinus limosus*, RI za *Ralstonia insidiosa*, RM za *Ralstonia mannitolilytica*, RP za *Ralstonia pickettii*, PS za *Pandoraea sputorum*, PP za *Pandoraea pulmonicola*, PAp za *Pandoraea apista*, PPn za *Pandoraea pnomenusa*, PF za *Pseudomonas fluorescens* in SM za *Stenotrophomonas maltophilia*. Vsak izolat je dobil še zaporedno številko. Referenčni sev *P. aeruginosa* ATCC 27853, izolat PA2, je služil kot pozitivna kontrola reakcije PCR v realnem času.

1. skupina: Izolati *P. aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnikov s CF in trije referenčni sevi:
  - *P. aeruginosa* ATCC 35032 (PA1)
  - *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PA2)
  - *P. aeruginosa* ATCC 15442 (PA3)
  - PA4
  - PA5
  - PA6
  - PA7
  - PA8
  - PA9
  - PA10

- PA11
  - PA37
  - PA38
  - PA39
2. skupina: Po Gramu negativne, nefermentativne paličaste bakterije fenotipsko podobne *P. aeruginosa*:
- P12
  - AX13
  - AX14
  - BC15
  - BV16
  - IL17
  - *Ralstonia insidiosa* LMG 18101 (RI18)
  - *Ralstonia mannitolilytica* LMG 18103 (RM19)
  - *Ralstonia picketii* LMG 18088 (RP20)
  - *Pandoraea sputorum* LMG 18819 RS(21)
  - *Pandoraea pulmonicola* LMG 18106 (PP22)
  - *Pandoraea apista* LMG 16407 (PAp23)
  - *Pandoraea pnomenusa* LMG 18087 (PPn24)
  - *I. limosus* LMG 20952 (IL25)
  - *A. xylosoxidans* LMG 1863 (AX26)
  - *Stenotrophomonas maltophilia* LMG 958 (SM27)
3. skupina: Izolati *Pseudomonas fluorescens* osamljeni iz dihal bolnikov s CF:
- PF28
  - PF29
4. skupina: Izolati *P. aeruginosa* in *P. fluorescens* osamljeni iz okoljskih vzorcev:
- PF30
  - PF33

- PF34
- PF35
- PF36
- PF40
- *Pseudomonas* sp. 41
- PA42
- PA43
- *Pseudomonas* sp. 44
- *Pseudomonas* sp. 45
- PF46

5. skupina: Izolati *P. aeruginosa* s sluznim fenotipom:

- PA47
- PA48
- PA49
- PA50
- PA51
- PA52
- PA53
- PA54
- PA55
- PA56
- PA57
- PA58
- PA59
- PA60
- PA61
- PA62

Skupno smo želeli oživeti 62 bakterijskih izolatov, vendar jih žal 11 na gojiščih ni poraslo.

### 3.1.2 Bakteriološka gojišča

Vsek izolat *P. aeruginosa* in *P. fluorescens* smo nacepili na svoj krvni agar in inkubirali 48 ur pri 37 °C. Enako smo naredili z izolati po Gramu negativnih, nefermetativnih bacilov le, da smo jih nacepili še na selektivna gojišča ter inkubirali 48 ur pri 37 °C ali 28 °C, odvisno od vrste gojišča.

#### Sestava gojišč

Sestava posameznih bakterioloških gojišč in bakterije katerih rast podpirajo posamezna gojišča je prikazana v Preglednicah 1 do 6.

Preglednica 1: Krvni agar.

Sestavine	Količine	Bakterije
BHI broth	37 g	Vsi izolati
Agar	15 g	
Destilirana voda	1 L	
Sterilna kri	50 mL	

Nacepljeno gojišče inkubiramo pri 37 °C.

Preglednica 2: Hranilni agar (Oxoid CM3) za *Achromobacter xylosoxidans*.

Sestavine	Količine in vrednost pH	Bakterija
Goveji ekstrakt Lab-Lemco	1g	<i>A. xylosoxidans</i>
Kvasni ekstrakt	2 g	
Pepton	5 g	
NaCl	5 g	
Agar	15 g	
Destilirana voda	1 L	
pH	7.4	

Nacepljeno gojišče inkubiramo pri 28 °C.

Preglednica 3: Gojišče za *Ralstonia pickettii*.

Sestavine	Količine in vrednost pH	Bakterija
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.45 g	<i>R. pickettii</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2.39 g	
Hranilni agar	1 L	
pH	6.8	

Nacepljeno gojišče inkubiramo pri 28 °C.

Preglednica 4: Gojišče za *Stenotrophomonas maltophilia*.

Sestavine	Količine in vrednost pH	Bakterija
Glukoza	10 g	<i>S. maltophilia</i>
Kvasni ekstrakt	5 g	
CaCO <sub>3</sub>	30 g	
Agar	15 g	
Destilirana voda	1 L	
pH	7.0	

Nacepljeno gojišče inkubiramo pri 28 °C.

Preglednica 5: Tripton-sojin agar (Oxoid CM131) za *Inquilinus limosus*, *Ralstonia insidiosa* in *Ralstonia mannitolilytica*.

Sestavine	Količine in vrednost pH	Bakterije
Tripton	15	<i>I. limosus</i> <i>R. insidiosa</i> <i>R. mannitolilytica</i>
Sojin pepton	5 g	
NaCl	5 g	
Agar	15 g	
Destilirana voda	1 L	
pH	7.3	

Nacepljeno gojišče inkubiramo pri 28 °C.

Preglednica 6: Triptikazno-sojino tekoče gojišče (BBL 11768) za *Pandoraea apista*, *Pandoraea pnomenusa*,  
*Pandoraea pulmonicola* in *Pandoraea sputorum*.

Sestavine	Količine	Bakterije
Kazein razgrajen z encimi pankreasa	17 g	<i>Pan. apista</i> <i>Pan. pnomenusa</i>
Sojina moka razgrajena s papainom	3 g	<i>Pan. pulmonicola</i> <i>Pan. sputorum</i>
NaCl	5 g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5 g	
Glukoza	2.5 g	
Destilirana voda	1 L	

Nacepljeno gojišče inkubiramo pri 37 °C.

#### Priprava gojišč

Vsa gojišča, razen krvnega agarja, pripravimo po istem postopku. Sestavine raztopimo v destilirani vodi s konstantnim mešanjem in blagim segrevanjem dokler niso vse popolnoma raztopljene. Sledi avtoklaviranje gojišč pri 121 °C za 15 minut. Sterilizirana gojišča ohladimo do 50 °C in vlijemo v Petrijeve posodice oziroma epruvete. Krvni agar pripravimo enako le, da na začetku vodi ne dodamo krvi. Ko se osnovno gojišče po avtoklaviranju ohladi na 50 °C mu dodamo sterilno kri in vlijemo v Petrijeve posodice.

Vsa gojišča je pripravila Služba za izdelavo gojišč in reagentov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

### 3.1.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času specifičen za *P. aeruginosa*

Protokol za PCR v realnem času specifični za gena *gyrB* in *ecfX* smo prevzeli po Anuju (2009) in ga priredili za napravo SmartCycler (Cepheid, Sunny Vale, ZDA).

#### Ekstrakcija DNA

##### 3.1.3.1.1 Ekstrakcija DNA s kuhanjem

Vsakemu bakterijskemu izolatu smo namenili eno mikrocentrifugirko, v katero smo odpipetirali 200 µL sterilne, destilirane vode. Nato smo v vodi resuspendirali eno polno bakteriološko zanko kulture. Bakterijsko suspenzijo smo segrevali 15 min pri 95 °C, sledila je 5-minutna centrifugacija pri 8000 rpm. Po končanem centrifugiranju smo odpipetirali 150 µL supernatanta in ga prestavili v nove mikrocentrifugirke ter z NanoDrop ND-1000 spektrofotometrom izmerili koncentracijo DNA. Tako pripravljene vzorce smo do analize shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

#### Reakcijska mešanica

Za vsak vzorec oziroma reakcijo smo porabili 12,5 µL QIAGEN Qantitect Probe Master Mix (QIAGEN, Doncaster, Avstralija); po 1µL 10 µM raztopine vsakega začetnega oligonukleotida (Applied Biosystems, Woolston, Velika Britanija); 0,4 µL 10 µM raztopine vsake hibridizacijske sonde (Applied Biosystems); 5,7 µL breznukleazne vode (Promega, Madison, ZDA) in 2 µL ekstrakta DNA. Skupna prostornina reakcijske zmesi je znašala 25 µL. Reakcijo *in vitro* pomnoževanja je katalizirala Ampli Taq DNA-polimeraza, ki je bila že predhodno vključena v Master Mix. Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov in hibridizacijskih sond so prikazana v Preglednici 7.

##### 3.1.3.2.1 Predpriprava reakcijske mešanice

Hibridizacijske sonde in začetne nukleotide smo dobili v liofilizirani obliki zato je bilo potrebno pripraviti založno raztopino s 100 µM koncentracijo po navodilu proizvajalca. Iz založne, 100 µM raztopine sond in začetnih oligonukleotidov smo pripravili še raztopine z delovno koncentracijo 10 µmol/L, ki smo jih nato uporabili v sami reakcijski zmesi.

Preglednica 7: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidiv in hibridizacijskih sond.

Okrajšava imena	Nukleotidno zaporedje (5'→3')
<i>ecfX</i> -F	CGCATGCCTATCAGGCGTT
<i>ecfX</i> -R	GAACTGCCAGGTGCTTGC
<i>ecfX</i> -FRET	TxR-ATGGCGAGTTGCTGCGCTTCCT-bhq
<i>gyrB</i> -F	CCTGACCATCCGTGCCACAAAC
<i>gyrB</i> -R	CGCAGCAGGATGCCGACGCC
<i>gyrB</i> -FRET	FAM-CCGTGGTAGACCTGTTCCCAGACC-bhq

#### Pogoji pomnoževanja tarčne DNA in izvedba

##### PCR v realnem času

PCR v realnem času smo izvedli na napravi SmartCycler (Cepheid,) pod naslednjimi pogoji:

- 15 min pri 95 °C
- 50 ciklov: 15 s pri 95 ° in 1 min pri 60 °C

## 3.2 MOLEKULARNA TIPIZACIJA BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa*

### 3.2.1 Bakterijski izolati

V analizo smo vključili 69 izolatov *P. aeruginosa*, od tega 59 osamljenih iz dihal 11 bolnikov s CF in 9 osamljenih iz kužnin bolnikov brez CF ter referenčni sev *P. aeruginosa* ATCC 27853. Analizirali smo izolate vseh bolnikov s CF pri katerih smo v letu 2010 potrdili kolonizacijo/okužbo s *P. aeruginosa*. Od vseh 141 izolatov *P. aeruginosa* osamljenih iz dihal bolnikov s CF v letu 2010 smo izbrali 59 izolatov in sicer tako, da smo pri vsakem bolniku naključno izbrali po en izolat na kužnino vzeto iz dihal. Vir vseh izolatov je bila zbirka bakterijskih izolatov bolnikov s CF Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Izolate smo označili z veliko tiskano črko glede na bolnika

iz katerega je bil izolat osamljen in zaporedno številko, ki jo izolat nosi v zbirki bakterijskih izolatov bolnikov s CF. Na ta način smo dobili 11 skupin izolatov, ki so bili osamljeni tekom leta 2010. Izolati bolnikov, ki nimajo CF so tvorili lastno skupino označeno s črko N in zaporedno številko. Izolati *P. aeruginosa* so prikazani v Preglednicah 8 do 11 glede na bolnika in mesec v katerem smo jih osamili iz dihal bolnikov.

Preglednica 8: Izolati osamljeni iz dihal bolnikov A, B in C.

Bolnik A		Bolnik B		Bolnik C	
Izolat	Datum osamitve	Izolat	Datum osamitve	Izolat	Datum osamitve
A813	15. 1. 2010	B860	18. 2. 2010	C843	3. 2. 2010
A914	23. 3. 2010	B868	23. 2. 2010	C850 s.t.	9. 2. 2010
A918	26. 3. 2010	B882	2. 3. 2010	C859	18. 2. 2010
A938	4. 4. 2010	B935 s.t.*	3. 4. 2010	C874	24. 2. 2010
A1040	21. 6. 2010	B981	15. 5. 2010	C929	31. 3. 2010
A1172	16. 9. 2010	B1048	24. 6. 2010	C986	13. 5. 2010
A1188	26. 9. 2010	B1066	7. 7. 2010	C1032	18. 6. 2010
A1347	28. 12. 2010	BB1143	4. 9. 2010	C1113	6. 8. 2010
		B1258	10. 11. 2010	C1168	15. 9. 2010
		B1311	11. 12. 2010	C1199	30. 9. 2010
				C1269	18. 11. 2010

\* s.t. je kratica, ki označuje sluzni fenotip.

Preglednica 9: Izolati osamljeni iz dihal bolnikov Č, D in E.

Bolnik Č		Bolnik D		Bolnik E	
Izolat	Datum osamitve	Izolat	Datum osamitve	Izolat	Datum osamitve
Č799	18. 12. 2009	D796 s.t.*	15. 12. 2009	E817	22. 1. 2010
Č908	17. 3. 2010	D854 s.t.	9. 2. 2010	E1074	10. 7. 2010
Č923	27. 3. 2010	D895 s.t.	11. 3. 2010	E1126	23. 8. 2010
Č1127	24. 8. 2010	D945	11. 4. 2010	E1133	25. 8. 2010
Č1136	1. 9. 2010	D1071 s.t.	9. 7. 2010		
Č1284	3. 12. 2010	D1240	28. 10. 2010		
Č1309	11. 12. 2010	D1280 s.t.	2. 12. 2010		

\* s.t. je kratica, ki označuje sluzni fenotip.

Preglednica 10: Izolati osamljeni iz dihal bolnikov F, G in H.

Bolnik F		Bolnik G		Bolnik H	
Izolat	Datum osamitve	Izolat	Datum osamitve	Izolat	Datum osamitve
F1068	9. 7. 2010	G837	1. 2. 2010	H1301	10. 12. 2010
F1154	10. 9. 2010	G1058	2. 7. 2010		
F1254	6. 11. 2010	G1178	19. 9. 2010		
F1316 s.t.*	13. 12. 2010				

\* s.t. je kratica, ki označuje sluzni fenotip.

Preglednica 11: Izolati osamljeni iz dihal bolnikov I, J in N.

Bolnik I		Bolnik J		Bolniki N	
Izolat	Datum osamitve	Izolat	Datum osamitve	Izolat	Datum osamitve
I1293	9. 12. 2010	J1091	27. 7. 2010	N1	5. 4. 2010
		J1162	11. 9. 2010	N2	5. 4. 2010
				N3	5. 4. 2010
				N4	5. 4. 2010
				N5	5. 4. 2010
				N6	5. 4. 2010
				N7	5. 4. 2010
				N8	5. 4. 2010
				N9	5. 4. 2010

Vsak izolat *P. aeruginosa* smo nacepili na svoj krvni agar in inkubirali 48 ur pri 37 °C.

### 3.2.2 Gelska elektroforeza v pulzirajočem polju

Hkrati smo lahko elektroforetsko ločili 13 izolatov, ker ima PFGE-agarozni gel 15 luknjic, od tega sta 2 rezervirani za molekularno lestvico. Celotni postopek traja 8 dni.

#### Priprava bakterijske suspenzije in agaroznih kockic ter *in situ* osamitev genomske DNA

Prvi dan smo vsak izolat *P. aeruginosa* nacepili na svoj krvni agar in inkubirali preko noči na 37 °C. Naslednji dan smo s pomočjo denzitometra pripravili 3,5 do 4,0 McF gosto suspenzijo izolatov v 1 mL pufra SE (75 mM NaCl, 25 mM EDTA). Sledila je priprava 25 mL 2 % agaroze z nizko temperaturo tališča (Invitrogen, Barcelona, Španija) v pufru SE. Tako pripravljeno agarozo smo nato raztopili na kuhalniku ter raztopljeno razpipetirali (po 0,5 mL) v mikrocentrifugirke. Sledilo je termostatiranje v termobloku pri 56 °C. V naslednjem koraku smo v mikrocentrifugirke z agarozo vmešali 0,5 mL bakterijske suspenzije ter mešanico razpipetirali v satovje za oblikovanje agaroznih kockic. Kockice so se strjevale v hladilniku 1 uro. Med tem časom smo v 200 mL pufra za lizo celic (6 mM Tris-HCl; 100 mM EDTA; 1 mM NaCl; 0,5 % Brij 58; 0,2 % natrijev deoksiholat; 0,5 % lavril-sarkozin; pH 7,5) raztopili 0,1 g lizocima (Sigma, Saint Louis, ZDA). Po približno 10 mL tako pripravljenega pufra smo nalili v posamezno Sanfordovo posodico in vanjo dali strjene agarozne kockice z ujeto bakterijsko kulturo. Sledila je preko nočna inkubacija na stresalniku pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo odstranili pufer za lizo celic in agarozne kockice prelili s približno 10 mL pufra za beljakovinsko razgradnjo (1 % lavril-sarkozin, 500 mM EDTA, pH 9,5) s 60 µg/mL proteinaze K (Sigma). Tako obdelane vzorce smo znova inkubirali na stresalniku preko noči pri 56 °C. Naslednji dan smo po končani inkubaciji odstranili pufer za razgradnjo beljakovin in kockice 3-krat sprali s pufrom TE (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH 7,5). Med vsakim spiranjem smo kockice v TE-pufru inkubirali 0,5 ure v hladilniku. 3-kratno spiranje smo ponovili še naslednji dan in tako osamljeno DNA shranili do restrikcije v hladilniku pri 4 °C.

### Restrikcija genomske DNA v agaroznih kockicah

Restrikcijo smo izvedli z restriktijsko endonukleazo SpeI (Fermentas, Cambridge, Velika Britanija), ki razreže genom *P. aeruginosa* na 14 do 25 fragmentov. Prepoznavno mesto SpeI je prikazano na Sliki 5. Za vsak vzorec smo pripravili po eno mikrocentrifugirko in vanjo odpipetirali 90 µL sterilne destilirane vode in 10 µL 10-kratnega pufra FastDigest Buffer (Fermentas). V tako razredčenem puferu smo vstavili po tretjino kockice in inkubirali 1 uro na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo pufer iz mikrocentrifugirke odpipetirali in zavrgli ter v iste mikrocentrifugirke z našimi vzorci dodali 99 µL sterilne destilirane vode; 12,5 µL 10-kratnega pufra FastDigest Buffer (Fermentas) in 1 µL restriktaze SpeI (Fermentas). Tako pripravljeni vzorce smo inkubirali preko noči pri 37 °C.



Slika 5: Prepoznavno mesto restriktaze SpeI.

### Gelska elektroforeza v pulzirajočem polju

Predzadnji dan smo pripravili agarozni gel za PFGE. In sicer, v 190 mL sterilne destilirane vode smo dolili 10 mL 0,5-kratnega pufra TBE (45 mM Tris-HCl, 45 mM borična kislina, 1 mM EDTA) in dodali 2,4 g agaroze za PFGE (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA). Tako pripravljeno 1,2 % agarozo smo raztopili v mikrovalovni pečici dokler se ni popolnoma raztopila. Staljeno agarozo smo nekoliko ohladili in vlili v modelček za gel, ki smo ga pripravili med taljenjem agaroze v mikrovalovni pečici. Po 30 min strjevanja smo iz gela vzeli glavniček in v luknjice s pomočjo krovnih stekelc previdno vstavili kockice. V dve luknjici, običajno v 7. in 14., smo dali molekularno lestvico 50 – 1000 kb (Sigma). Pri vstavljanju kockic v luknjice gela smo pazili, da jih nismo kakorkoli poškodovali. Pripravili smo še 2 L elektroforeznega pufra – v 1,9 L sterilne destilirane vode smo dali 100 mL 0,5-kratnega pufra TBE ter ga vlili v elektroforezno banjico naprave CHEF-DR

System (Bio-Rad). Ogrodje modelčka za gel smo razstavili in previdno odstranili agarozni gel z vstavljenimi kockicami ter ga namestili v elektroforezno banjico s pufrom. Elektroforeza je potekala 30 ur pri 11 °C z začetnim pulznim časom 1 s in končnim pulznim časom 59 s, pri jakosti električnega polja 6 V/cm, s kotom spreminjanja smeri toka 120 °.

Barvanje in analiza agaroznega gela.

Po končani PFGE smo gel barvali na stresalniku 20 do 30 min v raztopini etidijevega bromida (0,5 µg/mL). Po končanem barvanju smo odstranili raztopino etidijevega bromida in gel hitro sprali z vodo. Obarvan gel smo pregledali z UV-svetlobo ter fotografirali s programom Quantity One-4.6.9 (Bio-Rad). Sledila je še analiza rezultatov s programom GelCompar II 6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgija), ki je rekonstruiral filogenetska drevesa z metodo UPGMA z 0,5 % optimizacijo in toleranco Diceovega koeficiente podobnosti ter vizualna analiza restrikcijskih fragmentov na podlagi Tenoverjevih kriterijev ugotavljanja stopnje sorodnosti med izolati (Tenover in sod., 1995; Preglednica 12). Najpogosteji tip med genetsko povezanimi izolati smo označili kot izvorni tip oziroma pulzotip ter ga označili z veliko tiskano črko. Podtipe, torej izolate, ki so se razlikovali v največ 6 fragmentih in so zato tesno ali verjetno genetsko povezani smo označili z veliko tiskano črko genotipa in zaporedno številko.

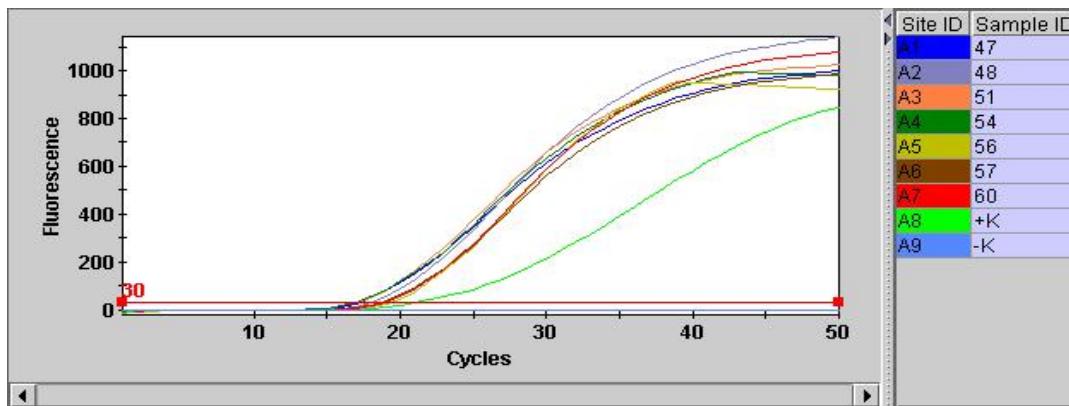
Preglednica 12: Tenoverjevi kriteriji za interpretacijo restrikcijskih vzorcev dobljenih s PFGE.

Kategorija	Število genetskih sprememb	Število različnih fragmentov
Genetsko neločljivi	0	0
Genetsko tesno povezani	1	2-3
Genetsko verjetno povezani	2	4-6
Genetsko nepovezani/nesorodni	≥3	≥7

## 4 REZULTATI

### 4.1 MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa*

Kot pozitivni rezultat PCR v realnem času smo obravnavali samo tiste vzorce, ki so bili pozitivni na oba testirana gena, *ecfX* in *gyrB*. Za pozitiven rezultat je morala izmerjena fluorescencija preseči osnovni fluorescenčni prag pri obeh genih. Pozitivna kontrola je bila v vseh poskusih vedno pozitivna in negativna kontrola vedno negativna. Primer grafičnega prikaza rezultatov PCR v realnem času je prikazan na Sliki 6.



Slika 6: Grafični prikaz rezultatov PCR v realnem času. Sigmoidne krivulje predstavljajo *gyrB*- pozitivni rezultat, v tem primeru – analizirani so bili sluzni izolati *Pseudomonas aeruginosa* – je negativna le negativna kontrola torej, svetlo modro obarvana vodoravna premica.

#### 4.1.1 Rezultati verižne reakcije s polimerazo v realnem času po skupinah

Rezultati dupleks PCR v realnem času so prikazani v Preglednicah 13 do 17.

Preglednica 13: Rezultati PCR-analize izolatov *Pseudomonas aeruginosa* iz kužnin bolnikov s cistično fibrozo in treh referenčnih sevov.

Številka izolata	<i>ecfX</i>	<i>gyrB</i>	Identifikacija
PA1 - 3	+	+	<i>P. aeruginosa</i>
PA4 - 11	+	+	<i>P. aeruginosa</i>
PA37 - 39	+	+	<i>P. aeruginosa</i>

Preglednica 14: Rezultati PCR-analize izolatov po Gramu negativnih, nefermentativnih bacilov fenotipsko podobnih *Pseudomonas aeruginosa*.

Številka izolata	<i>ecfX</i>	<i>gyrB</i>	Identifikacija
<b>P12</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>AX13</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>AX14</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>BC15</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>BV16</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>IL17</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>RI18</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>RM19</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>RP20</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>PS21</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>PP22</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>PAp23</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>PPn24</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>IL25</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>AX26</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>PM27</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>

Preglednica 15: Rezultati PCR-analize izolatov *Pseudomonas fluorescens* iz pljuč bolnikov s cistično fibrozo.

Številka izolat	<i>ecfX</i>	<i>gyrB</i>	Identifikacija
<b>PF28 -29</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>

Preglednica 16: Rezultati PCR-analize izolatov *Pseudomonas aeruginosa* in *Pseudomonas fluorescens* iz okoljskih vzorcev.

Številka izolat	Rezultat za <i>ecfX</i>	Rezultat za <i>gyrB</i>	Identifikacija
<b>PF31</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>PF32</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>PA33</b>	+	+	<i>P. aeruginosa</i>
<b>PF34</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>
<b>PA36</b>	+	+	<i>P. aeruginosa</i>
<b>PA40</b>	+	+	<i>P. aeruginosa</i>
<b>PA42</b>	+	+	<i>P. aeruginosa</i>
<b>PA43</b>	+	+	<i>P. aeruginosa</i>
<b>PF46</b>	-	-	Ni <i>P. aeruginosa</i>

Izolati PF30, PF35, *Pseudomonas* sp. 41, *Pseudomonas* sp. 44 in *Pseudomonas* sp. 45 niso bili vključeni v analizo, ker po 48-urni inkubaciji niso porasli na krvnem agarju.

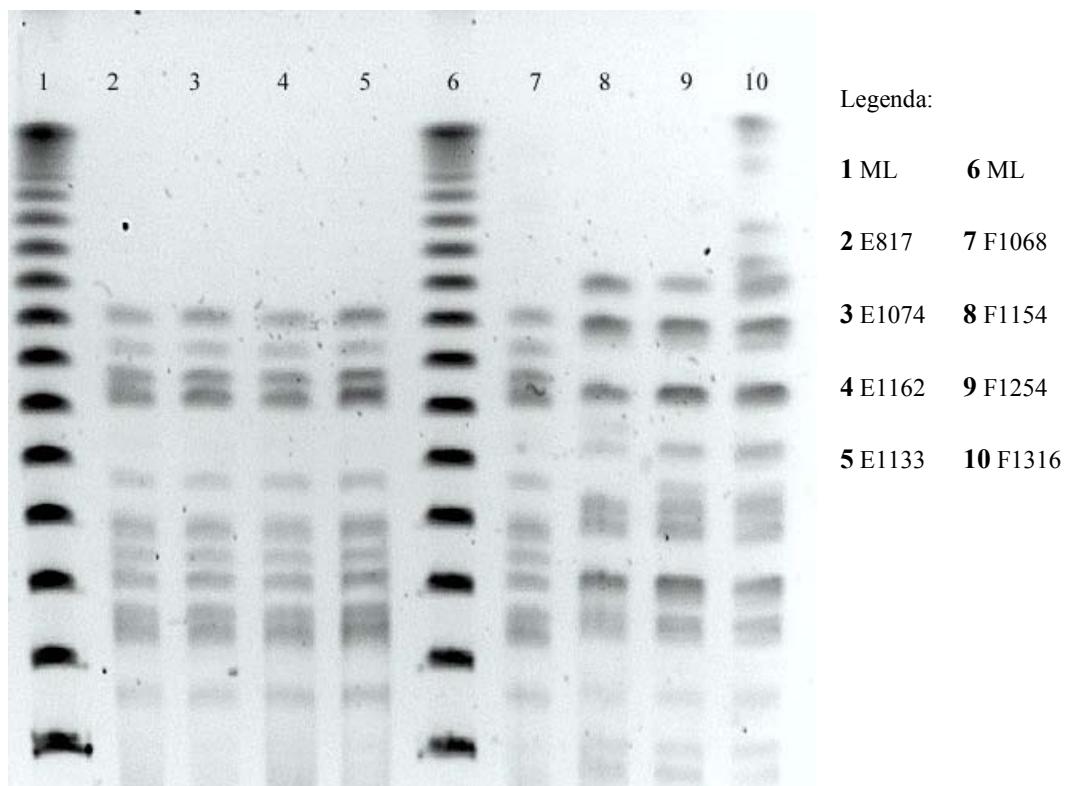
Preglednica 17: Rezultati PCR-analize izolatov *Pseudomonas aeruginosa* s sluznim fenotipom.

Številka izolat	<i>ecfX</i>	<i>gyrB</i>	Identifikacija
<b>PA47</b>	+	+	<i>P. aeruginosa</i>
<b>PA48</b>	+	+	<i>P. aeruginosa</i>
<b>PA51</b>	+	+	<i>P. aeruginosa</i>
<b>PA54</b>	+	+	<i>P. aeruginosa</i>
<b>PA56 - 61</b>	+	+	<i>P. aeruginosa</i>

Izolati PA49, PA50, PA52, PA53, PA55 in PA62 niso bili vključeni v analizo, ker po 48-urni inkubaciji niso porasli na krvnem agarju.

#### 4.2 MOLEKULARNA TIPIZACIJA BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa*

Na podlagi restrikcijskih vzorcev smo s pomočjo programa GelCompar II 6.5 (Applied Maths) analizirali vseh 69 vzorcev in izrisali pripadajoča filogenetska drevesa. Poleg računalniške analize smo naredili tudi vizualno analizo upoštevajoč Tenoverjeve kriterije interpretacije restrikcijskih vzorcev (Tenover in sod., 1995; Preglednica 12). Na podlagi vizualne analize restrikcijskih vzorcev smo vseh 56 izolatov osamljenih iz dihal bolnikov s CF razvrstili v 12 pulzotipov oziroma genotipov in 53 podtipov. Pulzotipi, podtipi, število izolatov *P. aeruginosa*, ki pripada posameznemu podtipu in razvrstitev po bolnikih s CF je prikazana v Preglednici 18. Primer gela z restrikcijskim vzorcem je prikazan na Sliki 7.



Slika 7: Restriktionski vzorec izolatov bolnikov E in F. Prvi in šesti stolpec prikazuje molekulske lestvice 50 do 1000 kb (ML). Stolci od 2 do 5 prikazujejo restriktionske vzorce izolatov osamljenih iz dihal bolnika E, stolci od 7 do 10 pa restriktionske vzorce izolatov osamljenih iz dihal bolnika F.

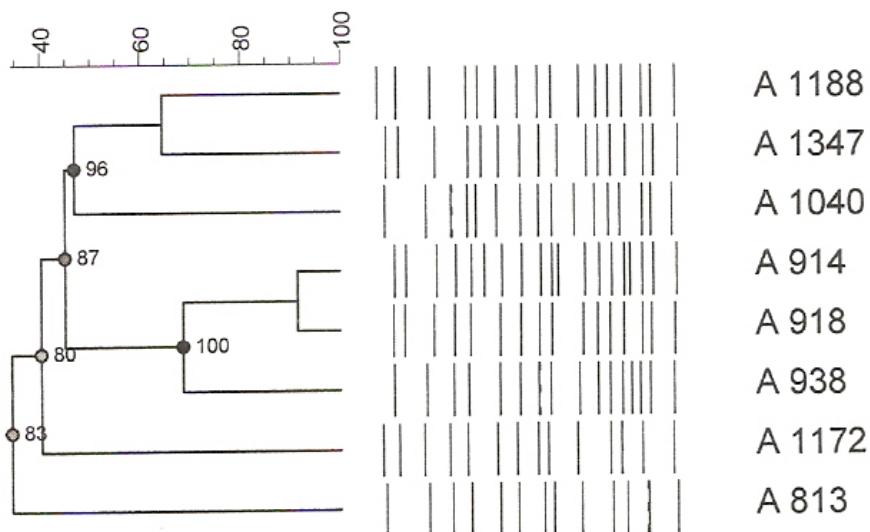
Preglednica 18: Število podtipov znotraj posameznega genotipa in njihove oznake ter razvrstitev po bolnikih s cistično fibrozo.

Pulzotip	Število izolatov	Število podtipov	Oznaka podtipov	Bolnik s cistično fibrozo
A	8	8	A1-8	A
B	10	10	B1-10	B
C	10	10	C1-10	C
Č	6	6	Č1-6	Č
D	6	6	D1-6	D
E	5	2	E1-2	E, F
F	3	3	F1-3	F
G	3	3	G1-3	G
H	1	1	H	H
I	1	1	I	I
J	2	2	J1-2	J
K	1	1	K	Č

Vsa filogenetska drevesa so izrisana z metodo UPGMA in imajo na razvejiščih zapisane vrednosti koeficiente kofenetične korelacije; če je vrednost slednjega nižja od 60 % ni zabeležena na dendrogramu. Nad vsakim dendrogramom se nahaja merilo, ki predstavlja odstotek podobnosti med primerjanimi izolati. Filogenetska povezanost izolatov *P. aeruginosa* po posameznih bolnikih je prikazana na Slikah 8 do 17, na Sliki 18 je filogenetsko drevo vseh analiziranih izolatov, predstavlja skupni dendrogram. Izolatov C874, D1240 in G999 nismo uspeli tipizirati zaradi razgradnje DNA.

#### 4.2.1 Izolati *Pseudomonas aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnika A

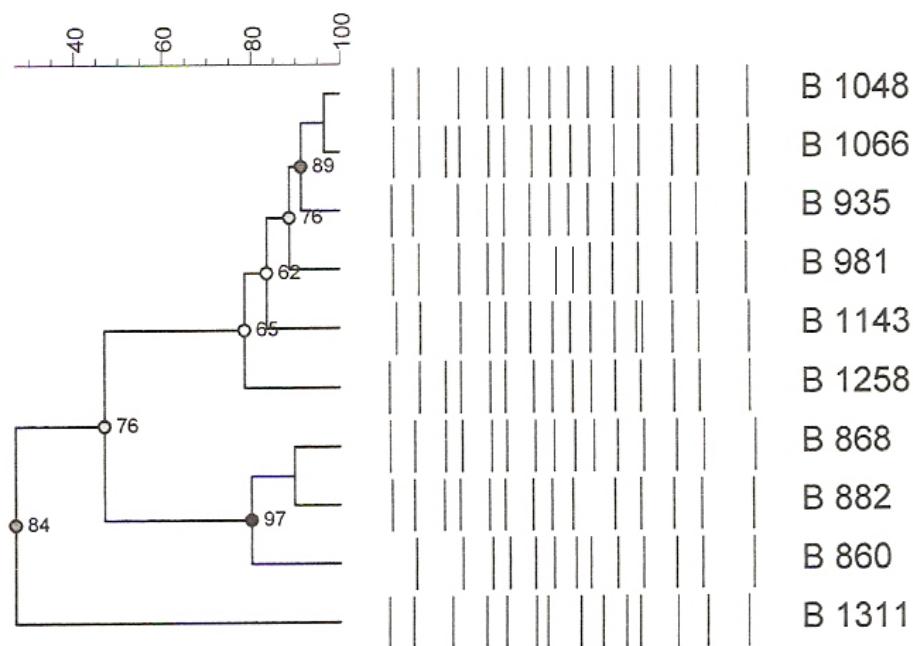
Izolati *P. aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnika A tvorijo skupni pulzotip, pulzotip A (Preglednica 18). Vsak izolat predstavlja en podtip pulzotipa A. Med osmimi izolati *P. aeruginosa* (Slika 8) lahko s 83 % verjetnostjo trdimo, da je izolat A813 najmanj, okrog 35 %, soroden vsem ostalim izolatom in je edini predstavnik podtipa A8. Gre za *P. aeruginosa* osamljen januarja 2010. Med vsemi izolati sta si najbolj sorodna A914 in A918, oba osamljena v marcu. Izkazujeta več kot 90 % podobnost, kar ju nedvomno uvrsti v skupno linijo. Najbolj jima je soroden izolat A938 osamljen mesec dni pozneje. Naslednjo skupino predstavljajo trije izolati, A1188, A1347 in A1040, osamljeni junija, septembra in decembra. A1188 osamljen septembra in A1347 osamljen decembra sta si podobna v 65 %, A1040, osamljen v mesecu juniju, jima je podoben v približno 47 %. V septembru smo osamili tudi izolat A1172, ki izkazuje približno 40 % podobnost do ostalih izolatov. Ker se oba septemrska izolata razlikujeta za okrog 60 % lahko domnevamo, da gre v vsakem primeru za okužbo/kolonizacijo iz drugega okoljskega ali kliničnega vira.



Slika 8: Dendrogram in restriktivni vzorec izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* bolnika A.

#### 4.2.2 Izolati *Pseudomonas aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnika B

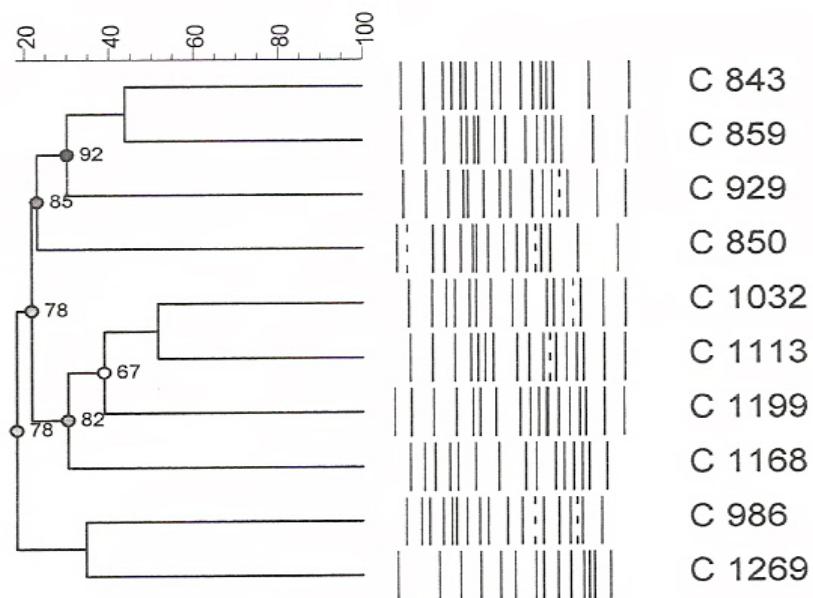
Izolati *P. aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnika B tvorijo skupni pulzotip, pulzotip B (Preglednica 18). Vsak izolat predstavlja en podtip pulzotipa B. Pri bolniku B imamo 3 jasno izoblikovane veje izolatov (Slika 9). Decembrski izolat B1311 je ostalim izolatom povsem nesoroden. Ta sev *P. aeruginosa* najbrž izhaja iz drugačnega vira kot vsi ostali in je še najbolj podoben izolatom bolnika G (Slika 18). Naslednjo skupino tvorijo trije "spomladanski" izolati, B860, B868 in B882, osamljeni v roku enega meseca. Izolata B868 in B882 kažeta 90 % podobnost kar ju uvršča v skupno evolucijsko linijo, ker je pa verjetnost te razvejitve manj kot 60 % ne moremo trditi, da ta razvejitev obstaja tudi v realnosti, razlikujeta se le v enem fragmentu. Naslednjo skupino tvorijo izolati osamljeni v pomladno-poletnih mesecih z izjemo B1258, ki je bil izoliran v mesecu novembru. B1258 je ostalim petim sevom podoben v približno 80 % in popolnoma različen od B1311, ki je bil osamljn mesec pozneje. Te velike razlike kažejo na izredno diverziteto *P. aeruginosa* in konstantno zamenjavo kolonizirajočih sevov. Izolat 1143, ki je bil osamljen septembra tudi izstopa iz skupne linije medtem, ko ostali z več kot 85 % podobnostjo tvorijo skupno evolucijsko linijo.



Slika 9: Dendrogram in restriktijski vzorec izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* bolnika B.

#### 4.2.3 Izolati *Pseudomonas aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnika C

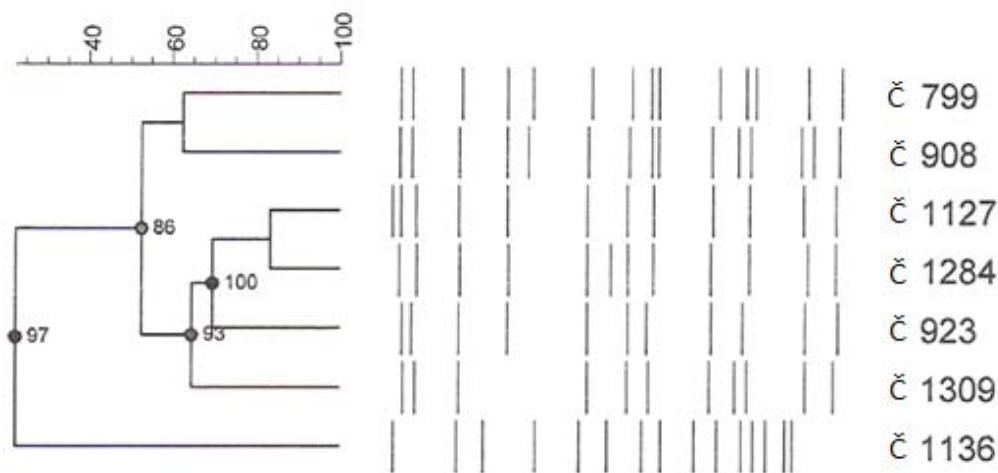
Izolati *P. aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnika C tvorijo skupni pulzotip, pulzotip C (Preglednica 18). Vsak izolat predstavlja en podtip pulzotipa C. Izolati bolnika C tvorijo lastno skupino (Slika 18), ki se od ostalih razlikuje za približno 70 %. Kljub jasno ločeni poziciji na skupnem dendrogramu gre za precej raznovrstne seve saj le pri dveh, C1032 osamljenem junija in C1113 osamljenem avgusta, preseže podobnost 50 % (Slika 10), za vse C izolate velja, da so genetsko verjetno povezani, saj se restrikcijski vzoreci razlikujejo v več kot 3 fragmentih. Tako za njima sta C843 in C859, oba sta bila osamljena februarja, ki sta si podobna v nekaj manj kot 45 %. Kljub majhni podobnosti tudi tukaj opazimo tri skupine – v prvo lahko uvrstimo izolate osamljene v zgodnje spomladanskem delu leta, v drugo izolate osamljene med junijem in septembrom ter v tretjo skupino še dva izolata osamljena maja, C986, in novembra, C1269. Glede na nizko stopnjo podobnosti izolatov, gre verjetno za sezonsko izmenjavo sevov.



Slika 10: Dendrogram in restrikcijski vzorec izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* bolnika C.

#### 4.2.4 Izolati *Pseudomonas aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnika Č

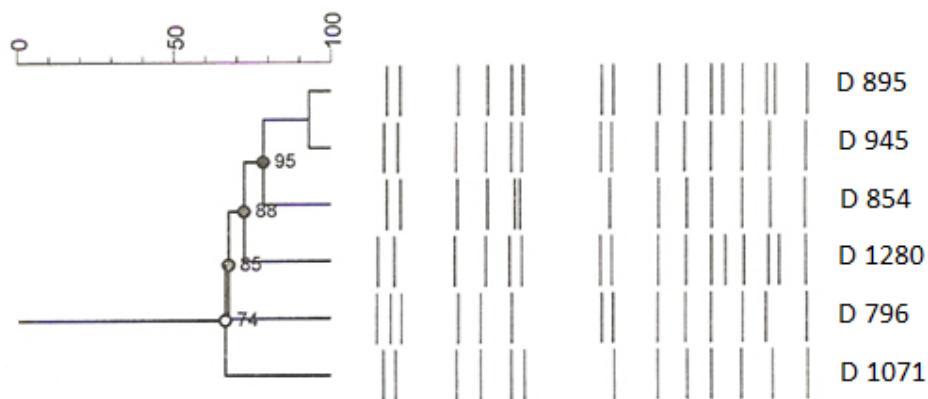
Izolate *P. aeruginosa* osamljene iz dihal bolnika Č uvrščamo v 2 pulzotipa – pulzotip Č in pulzotip K (Preglednica 18). Izolati bolnika Č tvorijo na skupnem filogenetskem drevesu (Slika 18) samostojno skupino, ki je v 46 % podobna skupini izolatov bolnika D in v 25 % vsem ostalim izolatom. Četudi gre za genetsko tesno povezane izolate le-ti izkazujejo precejšnjo pestrost saj ne tvorijo nobene skupne, sorodne linije (Slika 11) in so med seboj povezani popolnoma časovno neodvisno. Najbolj podobna sta si izolata Č1127 osamljen v avgustu in Č1284 osamljen v decembru, izkazujeta nekaj manj kot 85 % podobnost tako, da za las zgrešita kriterij skupne linije. Izolat Č1136, osamljen septembra, se razlikuje od ostalih izolatov v več kot 7 fragmentih. Je nesoroden vsem ostalim izolatom in predstavlja genotip K. Ker ni niti verjetno genetsko povezan z vsemi ostalimi izolati, gre najverjetnejše za okužbo/kolonizacijo s sevom nekega drugačnega okolja.



Slika 11: Dendrogram in restriktijski vzorci izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* bolnika Č.

#### 4.2.5 Izolati *Pseudomonas aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnika D

Izolati *P. aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnika D tvorijo skupni pulzotip, pulzotip D (Preglednica 18). Vsak izolat predstavlja en podtip pulzotipa D. Tudi izolati bolnika D tvorijo na skupnem dendrogramu (Slika 18) samostojno skupino ki je v 46 % podobna skupini izolatov bolnika Č in v 25 % vsem ostalim izolatom. Izolati D so si med seboj precej podobni (Slika 12) in sestavljajo genetsko povezano skupino, v tej skupini najdemo tudi izolat D895 osamljen marca in D945 osamljen aprila, ki kaže približno 95 % podobnost in manj kot 60 % verjetnost take razvezitve, kar ju uvrsti v skupno linijo. Tudi ostali izolati D izkazujejo visoko podobnost, od 63 do 80 %.

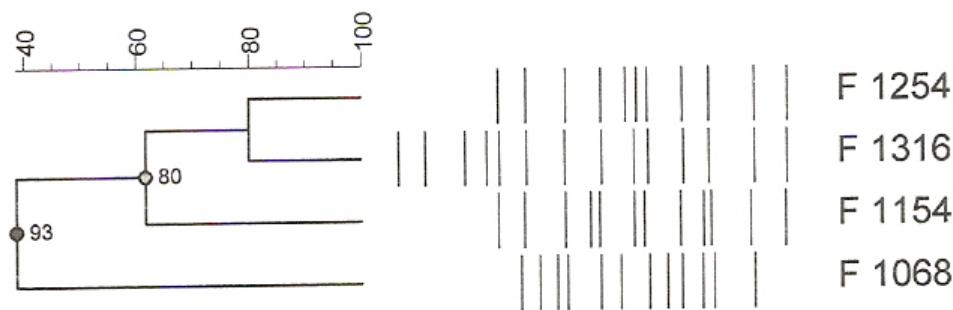


Slika 12: Dendrogram in restriktijski vzorci izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* bolnika D.

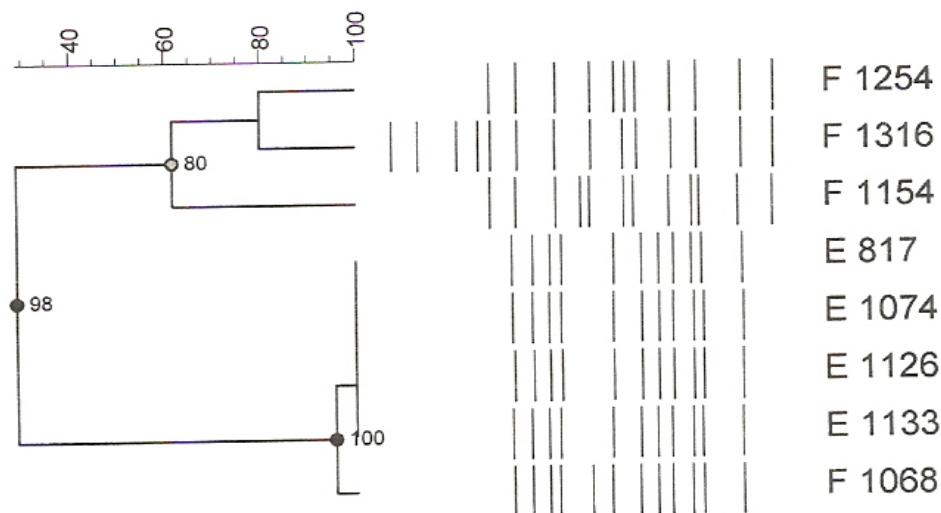
#### 4.2.6 Izolati *Pseudomonas aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnikov E in F

Izolati pulzotipov E in F tvorijo na skupnem dendrogramu (Slika 18) samostojno skupino, ki se od ostalih razlikuje za približno 72 %. Izolati E so genetsko neločljivi (Slika 14), četudi so izolirani tekom celega leta, od januarja do avgusta. To je edini primer kjer lahko trdimo, da je bolnik E kronično okužen/koloniziran z istim sevom *P. aeruginosa*. Izolati E tvorijo pulzotip E. Izolatom E so dokaj podobni izolati F, več kot 90 % podobnost kaže izolat F1068 osamljen v juniju. Na podlagi visokega odstotka podobnosti ga lahko

uvrstimo v isto linijo kot izolate E (Preglednica 18, Slika 14). Kljub izjemni podobnosti je verjetnost take razvezitve 100 % zato vemo, da ne gre za isti sev ampak zgolj za sevu E izjemno soroden izolat, ki ga uvrščamo v genotip E kjer predstavlja podtip E2. F1068 je bil osamljen v istem mesecu kot E1074 iz česar lahko domnevamo, da je mogoče prišlo do prenosa med bolnikoma. Ostali izolati F, F1154 osamljen septembra, F1254 osamljen novembra in F1316 osamljen decembra, izkazujejo 62 % podobnost s sevom E in izolatom F1068. Ti izolati predstavljajo genotip F kjer vsak izolat predstavlja en podtip (Preglednica 18).



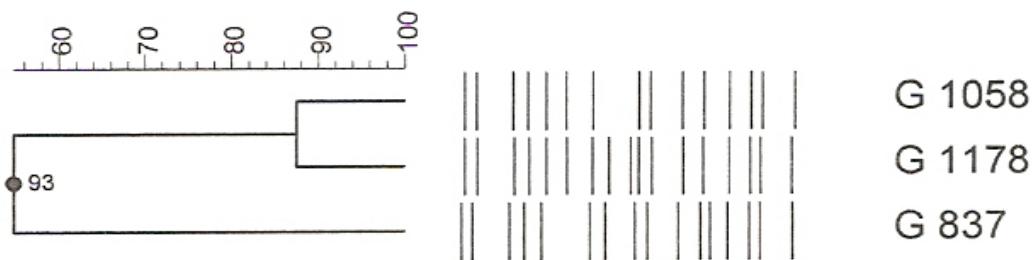
Slika 13: Dendrogram in restriktionski vzorci izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* bolnika F.



Slika 14: Dendrogram in restriktionski vzorci izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* bolnikov E in F.

#### 4.2.7 Izolati *Pseudomonas aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnika G

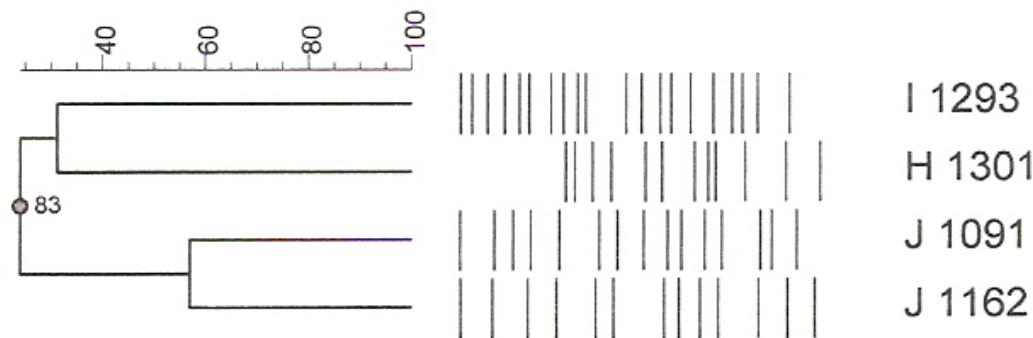
Izolati *P. aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnika G tvorijo skupni pulzotip, pulzotip G (Preglednica 18). Vsak izolat predstavlja en podtip pulzotipa G. Gre za skupino z 80 % podobnostjo (Slika 18) med izolati G837 osamljenim februarja, G1058 osamljenim julija in G1178 osamljenim septembra. Od ostalih izolatov se na skupnem filogenetskem drevesu razlikujejo za približno 70 %. Izolata G1058 in G1178 sta si 88 % podobna, z manj kot 60 % verjetnostjo take razvezitve (Slika 15) iz česar lahko sklepamo, da gre nedvomno za skupno linijo. Izolat G837 do ostalih dveh izolatov izkazuje približno 56 %.



Slika 15: Dendrogram in restrikcijski vzorec izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* bolnika G.

#### 4.2.8 Izolati *Pseudomonas aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnikov H, I in J

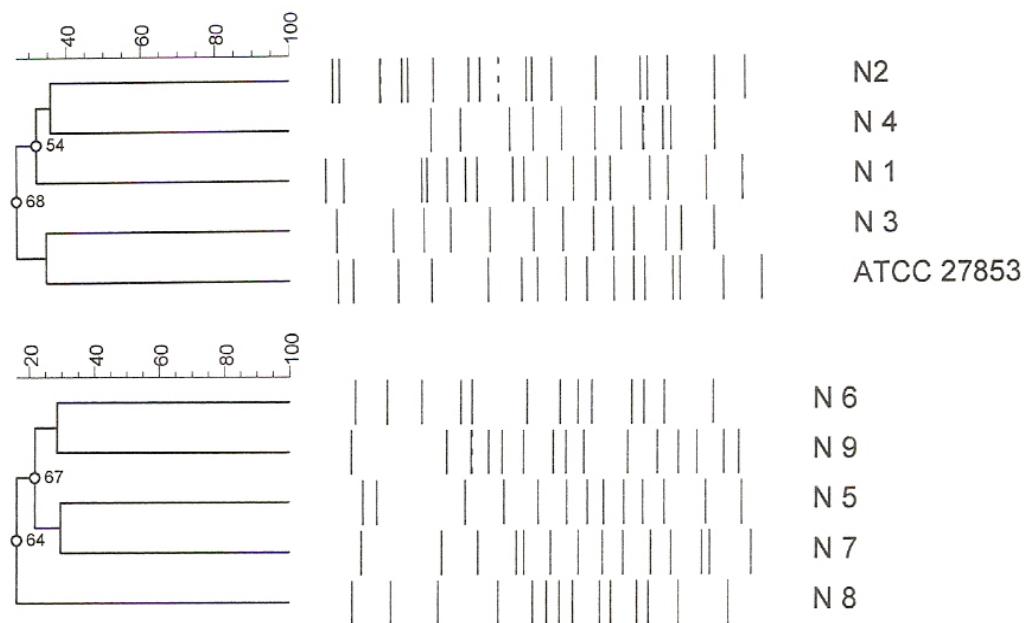
Izolate osamljene iz dihal bolnikov H, I in J smo obravnavali skupaj zaradi majhnega števila in posledično nemogoče primerjave znotraj skupine osamljene iz dotičnega bolnika. Izolata H1301 in I1293 osamljena decembra izkazujeta 30 % podobnost (Slika 16) in sta precej nesorodna vsem ostalim izolatom (Slika 18). Izolat J1091 osamljen julija in izolat J1162 osamljen septembra sta na skupnem dendrogramu pozicionirana skupaj (Slika 18) in izkazujeta približno 53 % podobnost (Slika 16). V podobnosti se najbolj približata izolatom A s približno 42 % podobnostjo (Slika 18). V primeru izolatov J, I in J lahko zaradi majhne podobnosti in majhnega števila osamljenih vzorcev trdimo, da definitivno ne gre za kronično kolonizacijo/okužbo ampak, da je prehodna okužba/kolonizacija bolj verjetna. Izolata H in I predstavljata lasten pulzotip H in I, izolata J pa pulzotip J – med seboj sta genetsko verjetno povezana in predstavljata vsak svoj podtip genotipa J.



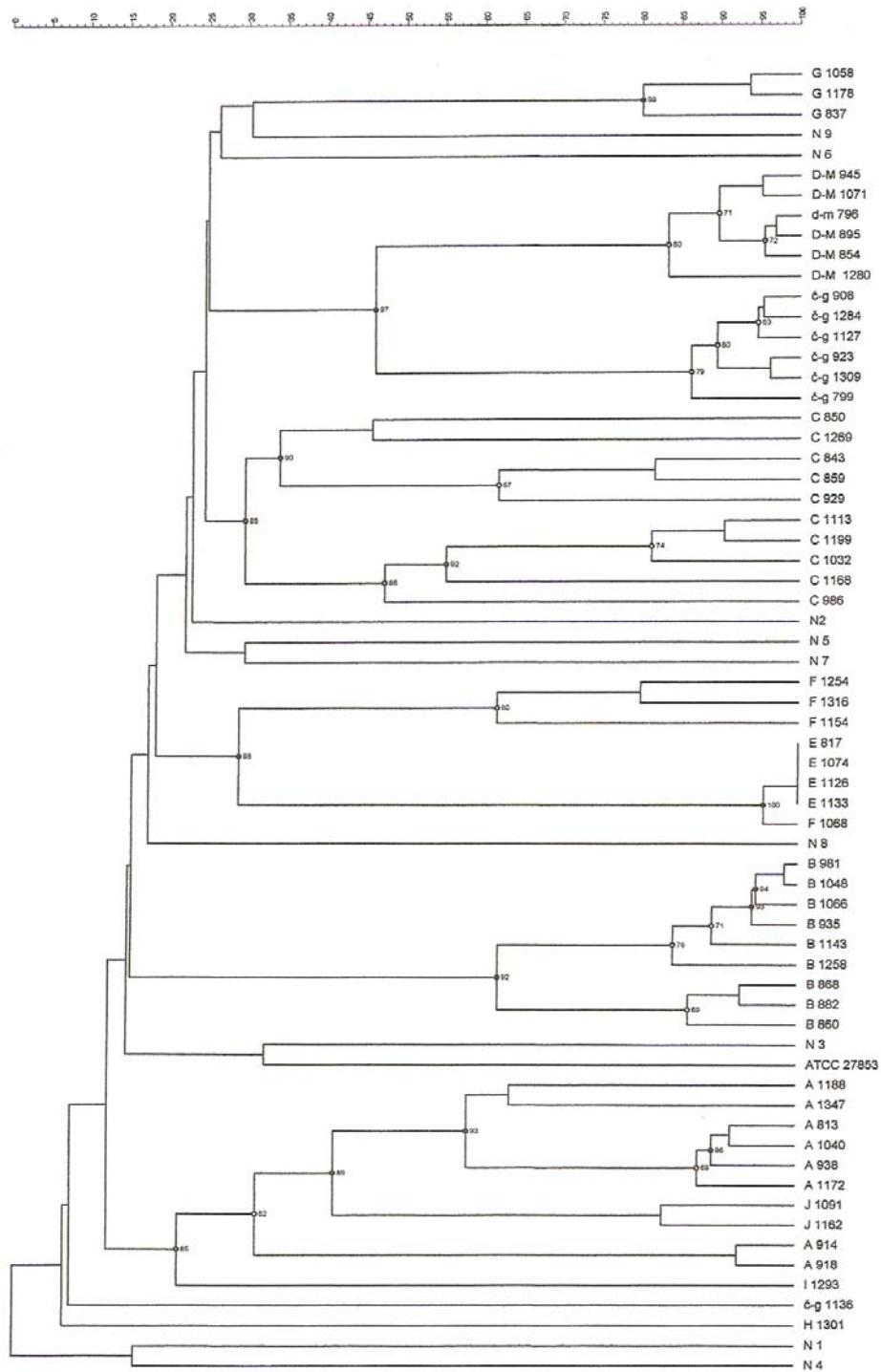
Slika 16: Dendrogram in restriktijski vzorci izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* bolnikov H, I in J.

#### 4.2.9 Izolati *Pseudomonas aeruginosa* osamljeni iz dihal bolnikov, ki nimajo cistične fibroze

Vsi izolati osamljeni iz dihal bolnikov, ki nimajo cistične fibroze so bili osamljeni v mesecu aprilu. Na skupnem dendrogramu (Slika 18) ne tvorijo lastne skupine ampak so razporejeni po celotnem filogenetskem drevesu. Na Sliki 17 vidimo, da se med seboj razlikujejo v več kot 7 fragmentih in so torej povsem nesorodni.



Slika 17: Dendrograme in restriktijski vzorci izolatov bakterije *Pseudomonas aeruginosa* bolnikov brez cistične fibroze in referenčnega seva *P. aeruginosa* ATCC 27853.



Slika 18: Skupno filogenetsko drevo izolatov *Pseudomonas aeruginosa* osamljenih iz dihal bolnikov A, B, C, Č, D, E, F, G, H, I in J s cistično fibrozo ter bolnikov, ki nimajo te dene bolezni.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Cilj diplomske naloge je bil pripraviti PCR protokol za identifikacijo fenotipsko neznačilnih izolatov *P. aeruginosa* ter genotipizirati izolate *P. aeruginosa* osamljene iz dihal bolnikov s CF.

### 5.1 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa* S PCR V REALNEM ČASU

Klasična identifikacija *P. aeruginosa* temelji na morfologiji kolonij in biokemijskih značilnostih presnove. Žal imajo te bakterije zaradi prilagoditve na specifične razmere v dihalih bolnikov s CF popolnoma spremenjene morfološko-fiziološke karakteristike kar oteži identifikacijo ter s tem zapozni učinkovito antibiotično terapijo. Zaradi fenotipskih sprememb se lahko postavi celo napačna diagnoza in posledično napačna terapija, ki lahko vodi v poslabšanje zdravstvenega stanja bolnika (Qin in sod., 2003). Fenotipsko neznačilne izolate *P. aeruginosa* lahko napačno identificiramo kot eno izmed njemu podobnih, vendar ne sorodnih, po Gramu negativnih, nefermentativnih, bacilarnih bakterij kot na primer *A. xylosoxidans*, *Burkholderia* spp., *Ralstonia* spp., *Pandoraea* spp., *I. limosus*, *S. maltophilia* in *Comamonas testosteroni*. Ker so fenotipske lastnosti bakterij zelo variabilne predstavljajo identifikacijske metode, ki temeljijo na analizi konservativnih regij DNA dobro alternativo.

#### 5.1.1 Učinkovitost in specifičnost identifikacije z dupleks PCR v realnem času

S problematiko identifikacije bakterije *P. aeruginosa* izolirane iz dihal bolnikov s CF so se ukvarjali številni avtorji (Qin in sod., 2003; Lavenir in sod., 2007; Motoshima in sod., 2007; Anuj in sod., 2009) in razvili bolj ali manj učinkovite molekularno-biološke metode identifikacije te bakterije. S temi metodami poskušamo dokazati prisotnost genov specifičnih za *P. aeruginosa*. Odkrili so kar precej vrstno specifičnih genov kot so *oprL*, *oprI*, *algD*, *toxA*, in *groES*, vendar so vsi našteti zelo podvrženi mutagenezi, tudi gen za 16S rRNA, ki velja za evolucijsko stabilnega v primeru *P. aeruginosa* ne pride v poštev za tarčno mesto (Qin in sod., 2003; Lavenir in sod., 2007). Zelo pomembni lastnosti identifikacijskih testov sta specifičnost in občutljivost, ki dajeta rezultatom dotičnega testa kredibilnost. Molekularno-biološki identifikacijski testi, ki dokazujejo prej omenjene gene so občutljivi vendar šepajo v specifičnosti. Ne samo, da so njihova tarčna mesta precej

genetsko nestabilna in posledično nezanesljiva, ampak problem predstavlja tudi nepoznavanje genoma nefermentativnih bacilov – lahko, da obstajajo polimorfizmi znotraj vrste ali med vrstami, kar ustvari podobno situacijo kot jo poznamo v primeru identifikacije z biokemično vrsto (Qin in sod., 2003). Iz teh razlogov se je pojavila ideja o uporabi dveh vrstno specifičnih tarčnih mest. Več tarč močno zveča specifičnost metode, ker imamo v primeru ene negativne reakcije še vedno eno pozitivno tarčo, ki prepreči zaključek, da je vzorec na *P. aeruginosa* negativen, torej z uporabo dupleks PCR v realnem času zmanjšamo število lažno negativnih rezultatov in vseh negativnih posledic, ki jih potegnejo za sabo (Anuj in sod., 2009). V tej diplomski nalogi smo s PCR v realnem času specifičnem za gena *gyrB* in *ecfX* analizirali 51 izolatov *P. aeruginosa* in *P. fluorescens*, protokol smo prevzeli po Anuju (2009) in ga priredili za napravo SmartCycler. Gena *gyrB* in *ecfX* sta specifična za *P. aeruginosa*, *gyrB* kodira podenoto B DNA-giraze, *ecfX* pa zunajcitoplazmatski sigma-dejavnik, ki sodeluje pri izražanju virulentnih dejavnikov (Anuj in sod., 2009). Kot že omenjeno je slaba stran uporabe teh dveh genov oziroma katerekoli kombinacije genov nepoznavanje genoma *P. aeruginosa* sorodnih in podobnih bakterij (Qin in sod., 2003). Kidd in sod. (2009) so pri uporabi istih genov za tarčna mesta kot v tej diplomi ugotovili, da tako zastavljen PCR v realnem času pravilno identificira 99.8 % izolatov *P. aeruginosa*, kar opozarja na pomembnost uporabe multiplih tarč. Tudi Motoshima in sod. (2007), ki so za identifikacijo uporabili PCR v realnem času, ki tarči *gyrB* so prišli do podobne specifičnosti, 98.9 %. Kot je razvidno iz rezultatov analize (poglavlje 4 Rezultati in 4.1 Molekularna identifikacija bakterije *P. aeruginosa*) smo vse izolate domnevno identificirali pravilno – vse reakcije z izolati *P. aeruginosa* so bile pozitivne in negativne za vse ostale fenotipsko podobne bacile. Torej, pravilno smo identificirali 100 % izolatov, kar je za spoznanje več kot prej omenjenih 99.8 % ali 98.9 %, vendar lahko tako visoko specifičnost pripisemo majhnemu vzorcu izolatov. Pri dovolj veliki testni populaciji, Kidd s sod. (2009) je na primer analiziral 2267, Motoshima s sod. (2007) pa 224 izolatov, bi lahko prišli do statistično pomembnih rezultatov in najbrž podobne specifičnosti kot prej omenjena avtorja.

Vse izolate *P. aeruginosa* iz dihal bolnikov s CF in vse tri referenčne seve (Preglednica 13) smo identificirali kot *P. aeruginosa*, isto velja za izolate *P. aeruginosa* s sluznim fenotipom (Preglednica 17) kar pomeni, da sluzna ovojnica, ki obdaja bakterijske celice ne

moti *in vitro* pomnoževanja DNA in je zato dupleks PCR v realnem času primeren identifikacijski test, ko imamo opravka s sluznimi izolati *P. aeruginosa*, ki so značilni za kronično okužene/kolonizirane bolnike s CF.

Analiza kliničnih izolatov po Gramu negativnih, nefermentativnih bacilov vključno s *P. fluorescens* je po pričakovanjih dala negativne rezultate (Preglednici 14 in 15), ker pač te bakterije nimajo genov *ecfX* in *gyrB*.

Po pričakovanjih je uspela tudi analiza izolatov iz okoljskih vzorcev (Preglednica 16); kot *P. aeruginosa* smo identificirali izolate PA33, PA36, PA40, PA42 in PA43 ter nobenega *P. fluorescens* kot *P. aeruginosa*.

V končni fazi lahko zaključimo, da je PCR v realnem času specifičen za *gyrB* in *ecfX* zelo učinkovita in zanesljiva identifikacijska metoda za razločevanje med *P. aeruginosa* in ostalimi predstavniki tega rodu ter fenotipsko podobnimi bakterijami. Gre za visoko specifično metodo z nekoliko nižjo občutljivostjo, ki jo kompenziramo z uporabo čiste kulture in pripravo relativno goste suspenzije. Pozitivna lastnost PCR v realnem času specifičnega za *gyrB* in *ecfX* je tudi, da za enkrat niso zaznali kompetitivne inhibicije in ostalih interakcij med oligonukleotidi, ki so pogoste pri uporabi multipleks PCR (Anuj in sod., 2009). Še vedno se za identifikacijo *P. aeruginosa* osamljenega iz dihal bolnikov s CF priporoča kombinacijo klasičnih kultivacijskih in biokemijskih metod z dupleks PCR v realnem času zaradi nepoznavanja genoma fenotipsko podobnih bakterij (Deschaght in sod., 2009; Kidd in sod., 2009).

## 5.2 MOLEKULARNA TIPIZACIJA BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa* Z GELSKO ELEKTROFOREZO V PULZIRAJOČEM POLJU

Z diplomsko nalogo smo želeli preveriti ali je res večina bolnikov s CF okužena/kolonizirana z genotipsko edinstvenim sevom in, če kronične okužbe/kolonizacije povzroča en genotip *P. aeruginosa*.

V primeru CF imajo okužbe s *P. aeruginosa* posebno dinamiko, ki vključuje zgodnjo, reverzibilno akutno fazo in ireverzibilno kronično fazo.

Za genotipizacijo in s tem za analizo strukture populacije *P. aeruginosa* se uporabljajo številne molekularno-biološke metode kar skoraj onemogoči primerjavo rezultatov med študijami (Pirnay in sod., 2009). Kljub pestremu izboru tipizacijskih metod je najpogosteje uporabljen prav PFGE. Na podlagi analize restrikcijskih vzorcev so ugotovili, da so različni bolniki s CF okuženi/kolonizirani z različnimi sevi, da več različnih sevov kolonizira enega bolnika, da se sevi lahko med kronično kolonizacijo periodično zamenjujejo, da lahko nekateri sevi kolonizirajo enega bolnika več mesecev ali let, da se posamezni sevi med kolonizacijo razvijajo in, da so bolniki, ki živijo v podobnem okolju okuženi/kolonizirani s podobnimi sevi (Struelens in sod., 1993; Kersulyte in sod., 1995; Pirnay in sod., 2009). Tudi z našim delom smo prišli do podobnih ugotovitev – tako z računalniško kot vizualno analizo restrikcijskih vzorcev. Če pogledamo skupni dendrogram (Slika 18) vidimo, da so si izolati med seboj podobni od manj kot 5 % pa do 100 % in, da ni prisotnih prevladujočih sevov kar nakazuje na zelo heterogeno populacijo in, da do prenosa *P. aeruginosa* med bolniki najverjetnejše ni prišlo, izjema sta bolnika E in F, ki sta bila kolonizirana/okužena z istim genotipom (Preglednica 18 in Slika 14). Na istem dendrogramu (Slika 18) lahko opazimo, da so izolati posameznih bolnikov med seboj bolj sorodni kot z izolati preostalih bolnikov iz česar lahko sklepamo, da so sevi močno prilagojeni na pogoje, ki vladajo v spodnjih dihalih bolnikov s CF in, da se v pljučih bolnikov razvijajo, to velja predvsem za linije, ki izkazujejo vsaj 85 % podobnost (Srymis in sod., 2004), v našem primeru so to izolati bolnikov A, B in Č. Dober primer so izolati osamljeni iz dihal bolnika Č saj so si med seboj tako različni (Slika 11), da bi lahko rekli, da se bolnik vedno znova okuži z novim izolatom, vendar nas 75 % nepodobnost z vsemi ostalimi izolati drugih bolnikov odvraca od te trditve (Slika 18). Mogoče gre za res zelo hipermutabilni sev, vendar je malo verjetno, da bi se v roku enega leta nabralo toliko mutacij, možno je pa tudi, da bolnik živi v specifičnem okolju, ki predstavlja vir konstantnih ponovnih okužb z geografsko specifičnimi različnimi sevi.

Tudi z vizualno analizo makrorestrikcijskih vzorcev ravno tako ugotovimo, da gre za precej heterogeno bakterijsko populacijo sestavljeno iz 12 različnih genotipov, vsak bolnik s CF je praktično koloniziran/okužen z enim genotipom, izjema je bolnik Č pri katerem smo tekom leta izolirali 2 različna genotipa. Iz te genotipsko specifične kolonizacije bolnikov lahko sklepamo, da gre za bakterije, ki so dobro prilagojene na svojega gostitelja.

Z vizualno analizo smo ugotovili, da sta bila 2 bolnika okužena z istim genotipom, genotipom E (Preglednica 18) kar nakazuje na morebitni prenos bakterije med bolnikoma. Da bi si bili izolati osamljeni v začetku leta 2010 med seboj bolj sorodni ni opaziti, enako velja za izolate osamljene proti koncu istega leta, je pa res, da so si v nekaterih primerih izolati osamljeni v približno enakem obdobju bolj podobni oziroma sorodni. Do bolj relevantnih zaključkov bi prišli, če bi obravnavali izolate osamljene v obdobju več let. Na skupnem dendrogramu (Slika 18) opazimo tudi, da izolati N, torej *P. aeruginosa* osamljeni iz bolnikov, ki nimajo CF, ne tvorijo lastne skupine ali genotipa, ampak so razporejeni po celotnem filogenetskem drevesu ter vsak izolat predstavlja lasten genotip, kar ponazarja visoko diverziteto sevov v okviru kliničnih vzorcev, tako tistih osamljenih iz bolnikov s CF kot tistih iz bolnikov, ki te dedne bolezni nimajo. Obe analitični metodi, tako vizualna kot računalniška, sta dali zelo podobne rezultate iz katerih smo potegnili enake zaključke. Tukaj je potebno omeniti, da je računalniška filogenetska analiza bolj občutljiva in bolj objektivna metoda saj je v primeru vizualne analize človeški faktor bolj prisoten, vsaj kar se tiče ugotavljanja razlik v poziciji, torej velikosti restriktijskih fragmentov.

Z rezultati filogenetske analize restriktijskih vzorcev lahko potrdimo ugotovitve različnih avtorjev (Struelens in sod., 1993; Kersulyte in sod., 1995; Pirnay in sod., 2009), da več različnih sevov kolonizira enega bolnika, da se sevi lahko med kronično kolonizacijo periodično zamenjujejo, da se posamezni sevi med kolonizacijo razvijajo in, da so bolniki, ki živijo v podobnem okolju okuženi/kolonizirani s podobnimi sevi. Z enim primerom, z izolati oziroma sevom E, smo potrdili tudi, da lahko nekateri sevi kolonizirajo enega bolnika več mesecev, ne pa tudi let, ker smo analizirali izolate osamljene v obdobju enega leta. Z izolatom F1068, ki ga uvrščamo v genotip E smo nakazali možnost prenosa bakterije *P. aeruginosa* med bolniki.

### 5.3 SKLEPI

Z diplomsko nalogo smo:

- pripravili in preizkusili PCR protokol v realnem času za identifikacijo fenotipsko neznačilnih izolatov *P. aeruginosa* osamljenih iz spodnjih dihal bolnikov s CF, ki temelji na dokazovanju genov *ecfX* in *gyrB*, ki sta specifična za *P. aeruginosa* in ga lahko uporabljamo za uspešno identifikacijo te bakterije,
- s filogenetsko analizo restrikcijskih vzorcev pridobljenih s PFGE ugotovili, da:
  - več različnih sevov *P. aeruginosa* kolonizira enega bolnika,
  - se sevi lahko med kronično kolonizacijo periodično zamenjujejo,
  - se posamezni sevi med kolonizacijo razvijajajo,
  - nekateri sevi kolonizirajo enega bolnika več mesecev.

## 6 POVZETEK

CF je ena najpogosteješih dednih bolezni. Bolezen prizadene različne organske sisteme, predvsem dihala. Porušeno elektrolitsko ravnovesje, ki je posledica mutacij gena *CFTR* povzroči v pljučih kopičenje in zastajanje sluzi, kar ustvari odlične pogoje za razvoj različnih patogenih mikroorganizmov (Lyczak in sod., 2002). Okužbe najpogosteje povzročajo bakterije *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* in *Pseudomonas aeruginosa*. Prav slednji je v primeru kronične okužbe glavni krivec za izredno poslabšanje delovanja pljuč do te mere, da je včasih potrebna presaditev (Lyczak in sod., 2002; Emerson in sod., 2002). V pljučih bolnikov s CF vladajo posebne razmere, ki povzročijo močan seleksijski pritisk katerega preživijo le najbolj prilagojene bakterije. *P. aeruginosa* se na razmre odziva s spremembami izražanja genov ter s točkovnimi mutacijami in horizontalnimi prenosmi DNA (Smith in sod., 2006; Pirnay in sod., 2009). Te genotipske spremembe se kažejo tudi v fenotipu bakterije kar močno oteži identifikacijo, ki pri *P. aeruginosa* temelji na morfologiji kolonij in značilnostih presnove (Speert in sod., 1990; Lyczak in sod., 2002). Spremenjen fenotip lahko vodi k napačni identifikaciji in s tem k neustreznem zdravljenju, zato so se pojavile potrebe po visoko specifičnih identifikacijskih metodah, ki bodo nedvomno dokazale pravega povzročitelja okužbe. Z diplomsko nalogo smo pripravili protokol za dupleks PCR v realnem času specifičen za *P. aeruginosa*. Tarčni mesti sta bila vrstno specifična gena *gyrB*, ki kodira podenoto B DNA-giraze, in *ecfX*, ki kodira zunajcitoplazmatski σ-dejavnik, ki sodeluje pri izražanju virulentnih faktorjev (Anuj in sod., 2009). *ecfX*- in *gyrB*-specifični PCR v realnem času se je izkazal za izredno specifičnega saj smo z njim v vseh primerih uspešno ločili med izolati *P. aeruginosa* in njemu fenotipsko podobnimi bakterijami, ki se pogosto napačno identificirajo kot *P. aeruginosa*, in obratno. Edina slaba stran te metode je nizka občutljivost, ki se kompenzira z uporabo čiste kulture za osamitev DNA in nekužnine.

Okužba/kolonizacija spodnjih dihal bolnikov s CF s *P. aeruginosa* ima značilno dinamiko – zgodnje, akutne faze okužbe/kolonizacije do katere pride zgodaj v otroštvu (Burns in sod., 2001) so povezane s fenotipsko značilnimi sevi *P. aeruginosa*, ki jih najdemo v

najrazličnejših okoljih in jih z zgodnjo, intenzivno antibiotično terapijo lahko eliminiramo; slej ko prej se pa razvijejo praktično neozdravljive kronične okužbe/kolonizacije, ki jih povzročajo geno- in fenotipsko spremenjeni sevi *P. aeruginosa* (Jelsbak in sod., 2007). Pojav in diverzitet *P. aeruginosa* ter dinamiko zamenjav sevov določenega genotipa se proučuje z različnimi tipizacijskimi metodami. V diplomski nalogi smo populacijo *P. aeruginosa* osamljenih iz pljuč bolnikov s CF karakterizirali s PFGE in filogenetsko analizo dobljenih restriktionskih vzorcev, ter ugotovili oziroma potrdili izsledke različnih avtorjev (Struelens in sod., 1993; Kersulyte in sod., 1995; Pirnay in sod., 2009), da več različnih sevov kolonizira enega bolnika, da se sevi lahko med kronično kolonizacijo periodično zamenjujejo, da se posamezni sevi med kolonizacijo razvijajo in, da so bolniki, ki živijo v podobnem okolju okuženi/kolonizirani s podobnimi sevi. Z enim primerom smo potrdili tudi, da lahko nekateri sevi kolonizirajo enega bolnika več mesecev.

## 7 VIRI

- Anuj S.N., Whiley D.M., Kidd T.J., Bell S.C., Wainwright C.E., Nissen M.D., Sloots T.P. 2009. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 63, 2: 127-131
- Armstrong D., Bell S., Robinson M., Bye P., Rose B., Harbour C., Lee C., Service H., Nissen M., Syrmis M., Wainwright C. 2003. Evidence of spread of clonal strain of *Pseudomonas aeruginosa* among cystic fibrosis clinics. Journal of Clinical Microbiology, 41, 5: 2266-2267
- Burns J.L., Gibson R.L., McNamara S., Yim D., Emerson J., Rosenfeld M., Hiatt P., McCoy K., Castile R., Smith A.L., Ramsey B.W. 2001. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. Journal of Infectious Diseases, 183, 3: 444-452
- Carmen J.C., Nelson J.L., Beckstead B.L., Runyan C.M., Robison R.A., Schaalje G.B., Pitt W.G. 2004. Ultrasonic-enhanced gentamicin transport through colony biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Journal of Infection and Chemotherapy, 10, 4: 193-199
- Cockerill F.R. III. 2003. Application rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for the diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 127, 1: 1112-1120
- Colin A., Wohl M. 1994. Cystic fibrosis. Pediatrics in Review, 15, 1: 192-200
- Deschgaert P., De Baere T., Van Simaeys L., Van Daele S., De Baets F., De Vos D., Pirnay J.P., Vaneechoutte M. 2009. Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. BMC Microbiology, 9, 1: 244-251

- Emerson J., Rosenfeld M., McNamara S., Ramsey B., Gibson R.L. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 34, 2: 91-100
- Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. III., Smith T.F. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reveiws*, 19, 1: 165-256
- Farrell P.M., Rosenstein B.J., White T.B., Accurso F.J., Castellani C., Cutting G.R., Durie P.R., LeGrys V.A., Massie J., Parad R.B., Rock M.J., Campbell P.W. 2008. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic fibrosis foundation consensus report. *Journal of Pediatrics*, 153, 2: 4-14
- Feliziani S., Luján A.M., Moyano A.J., Sola C., Bocco J.L., Montarano P., Fernández Canigia L., Argaraña C.E., Smania A.M. 2010. Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections. *PLoS ONE* 5, 9: e12669, doi: 10.1371/journal.pone.0012669: 12 str.
- Fothergill J.L., White J., Foweraker J.E., Walshaw M.J., Ledson M.J., Mahenthiralingam E., Winstanley C. 2010. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* genomic instability on application of typing methods for chronic cystic fibrosis infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 6: 2053-2059
- Grundmann H., Schneider C., Hartung D., Daschner F.D., Pitt T.L. 1995. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 3: 528-534
- Herschleb J., Ananiev G., Schwartz D.C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols*, 2: 677 - 684
- Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2008. Praktikum iz molekularne biologije – teoretični del. Ljubljana, Scripta: 104 str.

- Jelsbak L., Johansen H.K., Frost A.L., Thøgersen R., Thomsen L.E., Ciofu O., Yang L., Haagensen J.A.J., Høiby N., Molin S. 2007. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infection and Immunity*, 75, 5: 2214-2224
- Jerman I., Štern A. 1999. Molekulska evolucija. Ljubljana, Scripta: 129 str.
- Kersulyte D., Struelens M.J., Deplano A., Berg D.E. 1995. Comparison of arbitrary primed PCR and macrorestriction (pulsed-field gel electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 8: 2216-2219
- Kidd T.J., Grimwood K., Ramsay K.A., Rainey P.B., Bell S.C. 2010. Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 1: 263-268
- Kidd T.J., Ramsay K.A., Hu H., Bye P.T., Elkins M.R., Grimwood K., Harbour C., Marks G.B., Nissen M.D., Robinson P.J., Rose B.R., Sloots T.P., Wainwright C.E., Bell S.C., raziskovalci APCinCF. 2009. Low rates of *Pseudomonas aeruginosa* misidentification in isolates from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 5: 95-1137
- Lavent R., Jocktane D., Laurent F., Nazaret F., Cournoyer B. 2007. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 1: 20-29
- Legssyer R., Huaux H., Lebacq J., Delos M., Marbiax E., Lebecque P., Lison D., Scholte B.J., Wallemacq P., Leal T. 2006. Azithromycin reduces spontaneous and induced inflammation in ΔF508 cystic fibrosis mice. *Respiratory Research*, 7, 1: 134-147
- Liou T.G., Adler F.R., FitzSimmons S.C., Chaill B.C., Hibbs J.R., Marshall B.C. 2001. Predictive 5-year survivorship model of cystic fibrosis. *American Journal of Epidemiology*, 153, 4: 345-352

- Lyczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 5, 2: 194–222
- Mathee K., Ciofu O., Sternberg C., Lindum P.W., Campbell J.I.A., Jensen P., Johnsen A.H., Givskov M., Ohman D.E., Søren M., Høiby N., Kharazmi A. 1999. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology*, 145, 6: 1349-1357
- McCallum S.J., Corkill J., Gallagher M., Ledson M.J., Hart C.A., Walshaw M.J. 2001. Superinfection with a transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa* in adults with cystic fibrosis chronically colonised by *P. aeruginosa*. *Lancet*, 358, 9281: 558-560
- Motoshima M., Yanagihara K., Fukushima K., Matsuda J., Sugahara K., Hirakata Y., Yamada Y., Kohno S., Kamihira S. 2007. Rapid and accurate detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting *gyrB* gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58, 1: 53-58
- Mulcahy L.R., Burns J.L., Lory S., Lewis K. 2010. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *Journal of Bacteriology*, 192, 23: 6191-6199
- Mulet X., Maciá M.D., Mena A., Juan C., Pérez J.L., Oliver A. 2009. Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Bactericidal activity and selection of *nfxB* mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 4: 1552-1560
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaffer M.A. 2009. Medical microbiology. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Mosby Elsevier: 333-338
- NCBI. 2011. Taxonomy browser: *Pseudomonas aeruginosa*. Bethesda, NCBI - National Center for Biotechnology Information: 2 str. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=287&lvl=3&p=mapview&p=has\\_linkout&p=blast\\_url&p=genome\\_blast&keep=1&searchmode=1&unlock&lin=f](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=287&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&keep=1&searchmode=1&unlock&lin=f) (junij 2011)

- Parks Q.M., Young R.L., Poch K.R., Malcolm K.C., Vasil M.L., Nik J.A. 2008. Neutrophil enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: Human F-actin and DNA as targets for therapy. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 4: 492-502
- Pier G.B., Grout M., Zaidi T.S. 1997. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 22: 12088-12093
- Pirnay J.P., Bilocq F., Pot B., Cornelis P., Zizi M., Van Eldere J., Deschgaert P., Vaneechoutte M., Jennes S., Pitt T., De Vos D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS ONE*, 4, 11: e7740, doi: 10.1371/journal.pone.0007740: 20 str.
- Qin X., Emerson J., Stapp J., Stapp L., Abe P., Burns J.L. 2003. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting Gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 9: 4312-4317
- Sawicki G.S., Sellers D.E., Robinson W.M. 2009. High treatment burden in adults with cystic fibrosis: Challenges to disease self-management. *Journal of Cystic Fibrosis*, 8, 2: 91-96
- Schurr M.J., Martin D.W., Mudd M.H., Deretic V. 1994. Gene cluster controlling conversion to alginate-overproducing phenotype in *Pseudomonas aeruginosa*: Functional analysis in a heterologous host and role in the instability of mucoidy. *Journal of Bacteriology*, 176, 11: 3375-3382
- Shumaker H., Amlal H., Frizzell R., Ulrich C.D., Soleimani M. 1999. CFTR drives  $\text{Na}^+$ - $\text{nHCO}_3^-$  cotransport in pancreatic duct cells: A basis for defective  $\text{HCO}_3^-$  secretion in CF. *American Journal of Physiology*, 276, 1: C16-C25
- Smith E.E., Buckley D.G., Wu Z., Saenphimmachak C., Hoffman L.R., D'Argenio D.A., Miller S.I., Ramsey B.W., Speert D.P., Moskowitz S.M., Burns L.J., Kaul R.,

- Olson M.V. 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 22: 8487–8492
- Smith J.J., Travis S.M., Greenberg E.P., and Welsh M.J. 1996. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. Cell, 85: 229–236
- Speert D.P. 2002. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in Bioscience, 7, 1: 354-361
- Speert D.P., Farmer S.W., Campbell M.E., Musser J.M., Selander R.K., Kuo S. 1990. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to the phenotype characteristic of strains from patients with cystic fibrosis. Journal of Clinical Microbiology, 8, 2: 188–194
- Spencker F.B., Haupt S., Carlos M.C., Walter S., Lietz T., Schille R., Rodolff A.C. 2000. Epidemiologic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. Clinical Microbiology and Infection, 6, 11: 600-607
- Stern R.C. 1997. The diagnosis of cystic fibrosis. New England Journal of Medicine, 336, 1: 487-491
- Struelens M.J., Schwam V., Deplano A., Baran D. 1993. Genom macrorestriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients. Journal of Clinical Microbiology, 31, 9: 2320-2326
- Syrmis M.W., O'Carroll M.R., Sloots T.P., Coulter C., Wainwright C.E., Bell S.C., Nissen M.D. 2004. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. Journal of Medical Microbiology, 53, 11: 1089-109
- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. Journal of Clinical Microbiology, 33, 9: 2233-2239

- van Belkum A., Tassios P.T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N.K., Fussing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S., Struelens M. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, Suppl. 3: S1-S46
- van Mansfeld R., Jongerden I., Mootsma M., Buiting A., Bonten M., Willems R. 2010. The population genetics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different patient populations exhibits high-level host specificity. *PLoS ONE*, 5, 10: e13482, doi: 10.1371/journal.pone.0013482: 7 str.
- Wilschanski M., Zielenski J., Markiewicz D., Tsui L.C., Corey M., Levison H. 1995. Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *Journal of Pediatrics*, 127, 5: 705-710
- Žgur-Bertok D., Starčič Erjavec M. 2009. Teoretične osnove in navodila za vaje pri predmetu Mikrobna genetika. Ljubljana, Študentska založba: 116 str.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Katji Seme, dr. med., ki mi je omogočila opravljenje zelo zanimive diplomske naloge, zahvaljujem se za vse koristne nasvete in informacije tekom dela in pisanja diplomske naloge.

Najlepša hvala somentorici, asist. dr. Tjaši Cerar, univ. dipl. mikr., za pomoč pri delu, koristne nasvete in vse lepo preživete ure v laboratoriju.

Iskrena hvala tudi recenzentki, prof. dr. Evi Ružić-Sabljić, dr. med., za hitri strokovni pregled diplome.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani za potrežljivost, nasvete in praktično uvajanje v klinično bakteriologijo.

Hvala Stanislavu Ruparju, prof. rač., za pomoč pri oblikovanju diplomske naloge.

Najlepša hvala sošolkam in prijateljicam Anji Zagožen, Elizabeti Benigar, Nataši Tešić, Špeli Miklavič in Damjani Barbič za spodbudne besede in čudovita študijska leta.

Največja zahvala gre moji mami, ki mi je vedno, ob vseh situacijah stala ob strani, me spodbujala ter odlično svetovala.

Natura in minimis maxima.