

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Ústav lékařské mikrobiologie

**Marie Nováková**

**Zavedení mikrobiologické diagnostiky  
původců invazivních infekcí – *Bartonella  
henselae* a *Bartonella quintana***

*bakalářská práce*

Praha 2013

Autor práce: **Marie Nováková**

Vedoucí práce: **MVDr. Oto Melter, Ph.D.**

Oponent práce: **MUDr. Vanda Chrenková**

Datum obhajoby: **2013**

## Bibliografický záznam

NOVÁKOVÁ, Marie. *Zavedení mikrobiologické diagnostiky původců invazivních infekcí – Bartonella henselae a Bartonella quintana*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2013. Ústav lékařské mikrobiologie, 2013. s. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Oto Melter, Ph.D.

## Anotace

Bakteriální rod *Bartonella* zahrnuje malé, gramnegativní tyčinkovité bakterie, které jsou původci nových tzv. „emerging“ infekcí jako je *cat scratch disease* (CSD), která se projevuje typickou regionální lymfadenitidou. Další tzv. „emerging“ infekcí je bacilární angiomatoza projevující se bolestivými kožními a podkožními uzlíky. Bartonely také dále způsobují nemoci z heterogenní symptomatologií, z nichž byla onemocnění zvaná zákopová horečka nebo jihoamerická bartoneloza nejlépe zdokumentovány.

Povědomí o bartonelových infekcích je v ČR mezi praktickými lékaři velmi omezené a proto většina případů není diagnostikována.

Cílem mé práce bylo zhodnotit genotypové metody pro detekci dvou druhů bartonel (*B. henselae* a *B. quintana*) u kterých se domnívám, že jsou původci závažných infekcí v České Republice, včetně kultivačně negativních endokarditid.

Přehled literatury zabývající se bartonelami a souvisejícími infekcemi byl předpokladem bakalářské práce a je uveden v referenčním seznamu.

Kmeny rodu *Bartonella* byly identifikovány pomocí fenotypových a genotypových metod, a také byla testována jejich citlivost na antibiotika.

## Klíčová slova

Mikrobiologická diagnostika, bartonely, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, bartonelové infekce

## Annotation

Bacterial genus *Bartonella* includes small, gram-negative rod-shaped bacteria that are the agents of the new so called „emerging“ infections such as *cat scratch disease*, which is manifested typical as regional lymphadenitis. Another so called „emerging“ infections, bacillary angiomatosis presenting painful skin and subcutaneous nodules. *Bartonellae* also cause infections with heterogenic symptomatology from which a disease called trench fever or South American bartonellosis were best documented.

Awareness including bartonella infections among practitioners is usually limited, therefore, majority of the cases are not diagnosed.

Goal of my study was to evaluate genotypic methods for detection of two *Bartonella* species (*B. henselae* and *B. quintana* ) which I suspect are agents of serious infections in the Czech Republic including also culture negative endocarditis.

Review of literature dealt with *bartonellae* and corresponding infections was prerequisite of the bachelor thesis and are indicated in the references.

Strains of *Bartonella* genus were identified using phenotypic and genotypic approach and also their sensitivity to antibiotics were tested.

## Keywords

Microbiological diagnostics, bartonellae, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, bartonellosis

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením MVDr. Oto Melterem, Ph.D., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 23.4.2013

Marie Nováková

## **Poděkování**

Děkuji všem pracovníkům Ústavu lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol a zejména svému školiteli MVDr. Otovi Melterovi, PhD za ochotu a trpělivost, dále Mgr. Janu Tkadlecovi a Bc. Evě Bukáčkové za konzultace, trpělivost a cenné rady při práci v laboratoři a zpracování mé bakalářské práce.

# Obsah

<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>10</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
<b>1 BARTONELOVÉ INFEKCE.....</b>	<b>12</b>
1.1 B. BACILLIFORMIS – PRVNÍ PŮVODCE BARTONELOVÝCH INFEKČÍ.....	12
1.2 HISTORIE „MODERNÍCH“ BARTONEL.....	13
1.3 PATOGENEZE.....	15
1.3.1 Adheze k buňce.....	15
1.3.2 Penetrace do buňky .....	15
1.4 VÝSKYT, ROZDĚLENÍ INFEKČÍ A EPIDEMIOLOGIE .....	16
1.5 SYMPTOMY A PATOLOGIE ONEMOCNĚNÍ.....	17
1.5.1 Symptomy a patologie extrakutánních infekcí .....	17
1.5.2 Symptomy a patologie kožní bacilární angiomatózy .....	19
<b>2 ROD BARTONELLA .....</b>	<b>20</b>
2.1 MORFOLOGIE A FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI.....	20
2.2 RŮSTOVÉ A KULTIVAČNÍ VLASTNOSTI.....	20
2.3 DIAGNOSTIKA INFEKČÍ.....	21
2.3.1 Fenotypová a genotypová identifikace a typizace.....	21
2.3.1.1 Fenotypová identifikace.....	21
2.3.1.1.1 Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF).....	21
2.3.1.1.2 Testování citlivostí na antibiotika .....	22
2.3.1.2 Genotypová identifikace .....	23
2.3.1.3 Genotypová klonální analýza (typizace) .....	25
2.3.2 Serologie .....	26
<b>3 CÍL.....</b>	<b>28</b>
<b>4 MATERIÁL.....</b>	<b>29</b>
4.1 REFERENČNÍ KMENY .....	29
4.2 KLINICKÉ IZOLÁTY A VZOREK .....	29
4.3 KULTIVAČNÍ PŮDY .....	30
4.4 CHEMIKÁLIE A DIAGNOSTIKA .....	30
4.5 ROZTOKY .....	30
4.5.1 Gramovo barvení.....	30
4.6 MATERIÁL PRO PULZNÍ ELEKTROFORÉZU .....	31
4.6.1 Roztoky pro pulzní elektroforézu (PFGE) .....	31
4.6.2 Gel pro pulzní elektroforézu .....	31
4.7 MATERIÁL PRO PCR.....	31

4.7.1	Chemikálie pro přípravu PCR.....	31
4.7.2	Primery.....	32
4.8	MATERIÁL PRO PŘÍPRAVU ELEKTROFORÉZY.....	32
4.8.1	Agarózový gel pro elektroforézu.....	32
4.8.2	DNA marker.....	32
4.9	ANTIBIOTIKA.....	33
4.10	POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	33
<b>5</b>	<b>METODY.....</b>	<b>35</b>
5.1	FENOTYPOVÁ IDENTIFIKACE.....	35
5.1.1	Kultivační průkaz.....	35
5.1.2	Gramovo barvení.....	35
5.1.3	Biochemické vlastnosti.....	36
5.1.4	Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF).....	36
5.2	GENOTYPOVÁ IDENTIFIKACE.....	36
5.2.1	Izolace DNA.....	36
5.2.2	Amplifikace rodově ( <i>gltA</i> ) a druhově ( <i>ribC</i> , <i>ftsZ</i> ) specifických genů.....	37
5.2.3	Elektroforéza na agarózovém gelu.....	37
5.2.4	PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis).....	38
5.3	STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM.....	39
5.3.1	Diskový difúzní test.....	39
5.3.2	E-test.....	39
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>41</b>
6.1	FENOTYPOVÁ IDENTIFIKACE.....	41
6.1.1	Kultivační průkaz.....	41
6.1.2	Gramovo barvení.....	42
6.1.3	Biochemické vlastnosti.....	44
6.1.4	Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF).....	44
6.2	GENOTYPOVÁ IDENTIFIKACE.....	44
6.3	GENOTYPOVÁ KLONÁLNÍ ANALÝZA (TYPIZACE).....	49
6.4	STANOVENÍ CITLIVOSTI NA ANTIBIOTIKA.....	50
6.4.1	Diskový difúzní test.....	50
6.4.2	E-test.....	51
<b>7</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>56</b>
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERENČNÍ SEZNAM.....</b>	<b>60</b>



## SEZNAM ZKRATEK

ATB - antibiotika

BA – bacilární angiomatóza

BadA – *Bartonella adhesin A*

Beps – *bacterial effector proteins*

CSD – *cat scratch disease*

CNS – centrální nervový systém

dNTP – deoxyribonukleotidtrifosfát

EIA – *enzyme immuno assay*

ELFO – elektroforéza

ELISA – *enzyme-linked immuno sorbent assay*

ERIC - PCR - *enterobacterial repetitive intergenic consesus PCR*

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

IFA – *immunofluorescent assay*

ITS – *intergenic spacer*

MALDI-TOF – *Matrix-assisted laser desorption/ionization Time of Flight*

MIC – minimální inhibiční koncentrace

PCR – *polymerase chain reaction*

PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

RAPD - *Random amplified polymorphic DNA*

REP – PCR - *repetitive extragenic palindromic PCR*

RFLP – *restriction fragment lenght polymorfism*

RL – *Respiratory Specimen Lysis Reagent*

RN – *Respiratory Specimen Neutralization Reagent*

rRNA – ribozomální RNA

TAAAs – *trimeric autotransporter adhesins*

T4SS – *Type IV secretion system*

Vomps - *variably expressed outer-membrane proteins*

WS – Warthin-Starry

## ÚVOD

Bartonely jsou původci infekcí s pestrou klinickou symptomologií, včetně závažných, jako je např. endokarditida. Přímý průkaz bartonel se dosud v České Republice neprovádí, a proto jsem si zavedení mikrobiologické diagnostiky bartonel vybrala jako téma své bakalářské práce. Správná diagnostika těchto infekcí je předpokladem cílené antibiotické léčby pacientů.

Do rodu *Bartonella* dnes patří více než 20 druhů bakterií. Jsou to malé gramnegativní tyčinkovité bakterie, které způsobují nové tzv. *emerging* infekce, jako je *cat scratch disease* (CSD), projevující se typickou regionální lymfadenitidou, dále bacilární angiomatózu (BA), jejímiž typickými symptomy jsou kožní a podkožní uzlíky (noduly). Dále také vyvolávají nemoc zvanou zákopová horečka nebo jihoamerická bartonelóza. Bartonelové infekce jsou nejčastěji prokázány u lidí s infekcí virem HIV, u lidí se sníženým hygienickým standartem (zejména bezdomovci) nebo u pacientů s imunosupresivní terapií. Teoretická část práce se zabývá rešerší literatury. V praktické části byly provedeny a vyhodnoceny diagnostické metody, včetně metod molekulárních, vhodných pro jejich přímou diagnostiku v klinickém materiálu nebo identifikaci bakteriálních izolátů. Vektory infekce jsou nejčastěji ektoparazité - blecha kočičí (*Ctenocephalides felis*) pro *Bartonella henselae* a veš šatní (*Pediculus capitis*) pro *Bartonella quintana*.

# 1 Bartonelové infekce

## 1.1 B. bacilliformis – první původce bartonelových infekcí

„V roce 1870 vznikla v Peru velká epidemie při budování železnice z Limy do města Oroya. V r. 1885 zemřel student medicíny Daniel Carrión na horečku Oroya, když si aplikoval krev z kožních lézí *verruqa peruana*, aby potvrdil stejný původ obou nemocí. V roce 1909 byly objeveny mikroorganismy adherující k erytrocytům, které byly zkoumány doktorem A. L. Bartonem a v roce 1913 byl pro ně navržen nový rod *Bartonella*“ [1]. Dlouho byla známá pouze *Bartonella bacilliformis*, která způsobuje již zmíněné onemocnění Oroya fever. Je to pleomorfní, kataláza-pozitivní, gramnegativní tyčinka opatřená polárně lokalizovanými flagelami. Původně byla zařazena do rodu *Rochalimaea*. Jediným známým rezervoárem tohoto původce je člověk a vektorem přenosu komárek rodu *Lutzomyia* [1].

Onemocnění má dvě formy, respektive dvě fáze. Horečka Oroya je akutní onemocnění začínající výraznými chřipkovitými příznaky (vysoká horečka, nechutenství, pocení, zimnice atd.) s anorexií, těžkými myalgiemi, artralgiemi a bolestmi hlavy. Poté se přidávají bolesti břicha, zvracení, někdy ikterus, mnohočetná lymfadenopatie, petechie, ekchymózy až sufuze, trombocytopenie, meningoencefalitida s delirantními stavy a křečemi, dyspnoe a projevy orgánové ischémie, která souvisí s rychle se horšící anémií se zkrácenou životností erytrocytů napadených *B.bacilliformis*. Letalita této první fáze Carriónovy choroby se pohybuje od 10% do 40%. U nemocných, kteří nejsou pod antibiotickou léčbou, se po několika týdnech až měsících, v jejichž průběhu přetrvává asymptomatická bakteriémie, objevuje fáze eruptivní, zvaná *verruqa peruana*, kterou zobrazuje **Obrázek č. 1**. Při ní se na kůži objevují miliární skvrnky, které přecházejí v papuly a posléze uzly či hrboly. Z nich pak vznikají léze podobné hemangiomům. Histologie těchto lézí potvrzuje neovaskulární proliferaci s občasným výskytem bakterií v intersticiu. Tyto léze často krvácejí a mají tendenci k tvorbě vředu. Někdy se podobné útvary objevují i na sliznicích a na vnitřních orgánech, např. na sliznici trávicího ústrojí, což se projeví hematemézou a melénou. Tyto projevy trvají několik měsíců [1, 2].



**Obrázek č. 1.** Nodulární podkožní léze *verrua peruana* na rukách obyvatele peruánských And [2]

Z důvodu endemického výskytu výhradně v horských oblastech Peru, Ekvádoru a Kolumbie, se nebudu *B. bacilliformis* v této práci dále zabývat.

## 1.2 Historie „moderních“ bartonel

Historie tzv. „moderních“ bartonel, ke kterým dnes patří 24 druhů a 3 poddruhy, jež jsou nejvýznamnější z nich uvedeny v **Tabulce č. 1**, začíná až v 80. letech 20. století [2].

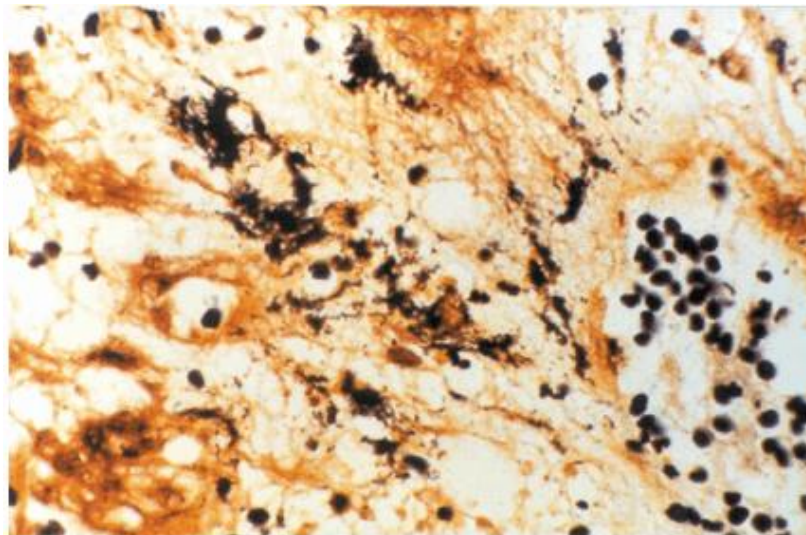
<b>Patogenní</b>	<i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i>
<b>Podmíněně patogenní</b>	<i>B. alsatica</i> , <i>B. koehlerae</i> , <i>B. clarridgeiae</i> , <i>B. elizabethae</i> , <i>B. grahamii</i> , <i>B. rochalimae</i> , <i>B. tamiae</i> , <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i> , <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i> ,
<b>Nepatogenní</b>	<i>B. australis</i> , <i>B. birtlesii</i> , <i>B. bovis</i> , <i>B. capreoli</i> , <i>B. chomelii</i> , <i>B. doshiae</i> , <i>B. peromysci</i> , <i>B. phoceensis</i> , <i>B. rattimassiliensis</i> , <i>B. schoenbuchensis</i> , <i>B. talpae</i> , <i>B. taylorii</i> , <i>B. tribocorum</i> , <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>

**Tabulka 1.** Přehled druhů a poddruhů bakterií rodu *Bartonella* patogenních, podmíněně patogenních a nepatogenních pro člověka.

Nejstarší známé onemocnění vyvolané bartonelami, je nemoc z kočičího škrábnutí (CSD – *cat scratch disease*), které jako první v roce 1931 klinicky rozpoznal Debré a v roce 1950 tato pozorování publikoval [3]. Názory na původce CSD se v průběhu let měnily. Ze začátku se za původce infekce pokládaly chlamydie a viry. Až v

roce 1983 byla použita speciální metoda na stříbření spirochét Warthin-Starry (**Obrázek č. 2**) ve tkáni lymfatických uzlin u pacientů s CSD [63]. Zjistilo, že se jedná o pleomorfní, gramnegativní tyčinku pomocí Gramova barvení. V roce 1988 byl izolován a kultivován předpokládaný původce z lymfatických uzlin u 10 pacientů z 19 s CSD, kteří splňovaly tři ze čtyř klasických kritérií CSD: 1. kontakt s kočkou, s přítomností primární kožní nebo oční léze, 2. pozitivní kožní test, 3. regionální lymfadenopatie a 4. charakteristické histologické změny v lymfatických uzlinách [15]. Pro tuto gramnegativní bakterii byl zaveden termín "bacil nemoci z kočičího škrábnutí" a byl pojmenován *Afipia felis* ačkoliv v následujících letech nebyl tento mikroorganismus od pacientů s infekcí již nikdy izolován.

Etiologické agens tohoto onemocnění však prokázal v roce 1990 amplifikací genu pro 16S rRNA Relman a kultivačně v roce 1992 Welch a Regnery [4]. Šlo rovněž o gramnegativní tyčinkovitou bakterii ve tkáni, barvitelnou WS, které gen pro 16S rRNA byl nejvíc podobný rodu *Rochalimaea* (*Bartonella quintana*). Rod *Rochalimaea* byl v roce 1993 reklasifikován do rodu *Bartonella* [61].



**Obrázek č. 2.** Lymfatická uzlina barvená metodou Warthin-Starry. Černě zbarvená místa jsou bakterie *Bartonella bacillus* [62]

## 1.3 Patogeneze

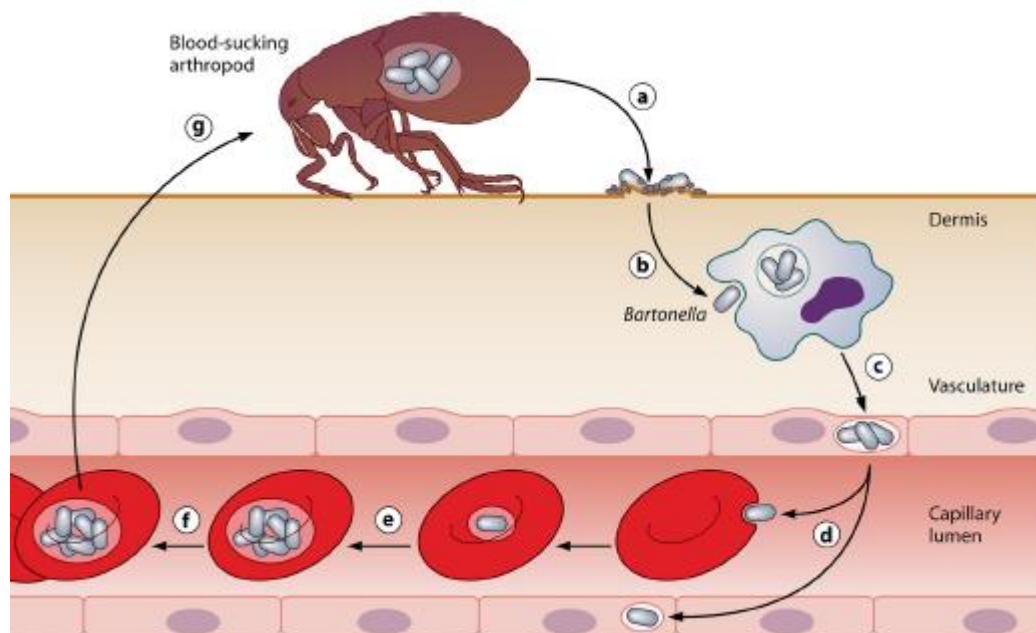
### 1.3.1 Adheze k buňce

Adheze k hostitelským buňkám představuje první krok infekčního procesu a je jedním z rozhodujících prvků patogenity *B. henselae* a *B. quintana*. Bartonely jsou schopny vyvolat vaskulární proliferaci a intraerytrocytární bakteriemi. Svou roli v adhezi hrají autotransportní adheziny (TAAs – *trimeric autotransporter adhesins*), jako je bartonelový adhezin A (BadA) u *B. henselae* a tzv. adheziny Vomps ( *variably expressed outer-membrane proteins* ) u *B. quintana*. Tyto adheziny zprostředkovávají kromě adheze rovněž navození naprogramování hostitelské buňky. Tyto TAAs patří k sekrečnímu systému typu V (T5SS). Další význam v adhezi mají tzv. Trw - konjugační systémy rodu *Bartonella*, které zprostředkovávají pro hostitele specifickou přilnavost k erytrocytům. Dalšími potencionálními adheziny jsou vláknité hemaglutininy a několik proteinů vnější membrány [5].

### 1.3.2 Penetrace do buňky

Bartonely jsou přenášeny krev sajícími členovci, které infikují savčí hostitelské buňky specifickým způsobem (viz **Obrázek č. 3**). Infekční proces bartonel je podporován efektorovými proteiny tzv. *Beps* (*Bartonella effector proteins*). Tyto proteiny jsou injikovány do hostitelských buněk pomocí sekrečního systému typu IV (T4SS) VirB/D4. Bakteriální vazba na erytrocyty je zprostředkována Trw, dalším T4SS systémem. T4SS jsou aparáty související s bakteriální konjugací používané pro DNA přenos mezi bakteriemi. Staly se faktory hostitelské adaptability poskytující hostitel-specifickou adhezi nebo přemístění bakteriálních efektorových proteinů (*Beps*) do hostitelských buněk. Bartonely kromě erytrocytů napadají i jiné druhy buněk, např. endoteliální buňky, monocyty, makrofágy a dendritické buňky. Vazbou bartonel na hostitelskou buňku se spouští buněčná absorpce. Zásadní fází v infekci jaderných buněk je adheze na extracelulární matrix a plazmatickou membránu hostitelské buňky. Výzkumy *in vitro* ukázaly, že bartonely obsahují velké množství faktorů virulence, které modulují odpověď napadených buněk. Následně jsou bakterie vyplaveny do krevního řečiště, kde napadnou erytrocyty a vznikne tak typická intraerytrocytární

bakteriemie. Na rozdíl od jaderných buněk, v erythrocytech nebyl prokázán aktivní membránový transport. Bartonely mohou napadat různě staré erythrocyty [16, 19, 50].



**Obrázek č. 3** Přenos vektorem (a), pomocí fagocytů (b) kolonizace primární niky – cévní endotel (c) perzistence a průnik do krve (d) vstupují do erythrocytů (e,f) a reinfikují cévní endotel (modifikováno podle Jarma a Dehio, 2012).

## 1.4 Výskyt, rozdělení infekcí a epidemiologie

Infekce způsobené moderními bartonelami se vyskytují na všech světadílech s výjimkou Antarktidy, a to jak v rozvojových, tak vyspělých zemích (např. USA, Kanada, Francie, Austrálie, státy Evropské unie, Japonsko, Jižní Korea, Izrael, Nový Zéland, ale i Afrika a některé státy Indie) [6, 7, 8].

Podle lokalizace patologických projevů, můžeme bartonelové infekce rozdělit na 2 skupiny. Na extrakutánní infekce, kam patří lymfadenitidy jejímž nejčastějším zástupcem je nemoc z kočičího škrábnutí, dále *peliosis hepatis*, meningitida nebo endokarditidy. Druhou skupinou onemocnění způsobených bartonelami jsou kožní infekce, zejména jde o bacilární angiomatózu [3].

**Extrakutánní bartonelové infekce.** Typickým představitelem extrakutánních infekcí jsou lymfadenitidy, jejímž nejčastějším projevem je onemocnění z kočičího

škrábnutí. Příčinou tohoto onemocnění je poranění od kočky, které jsou rezervoárem *B.henselae*, kdy v místě rány vznikne zarudlá papula nebo pustula, později dochází ke zvětšení mízních uzlin, které přetrvává několik týdnů až měsíců. Nejčastěji jsou postiženy axilární uzliny a uzliny hlavy a krku. Zhruba 87% všech pacientů jsou děti mladší 18 let vzhledem k jejich vřelejšímu vztahu a častějšímu kontaktu s kočkami a koťaty. K dalším extrakutánním bartonelovým infekcím patří hlavně postižení jater (*peliosis hepatis*) a endokarditidy. Postižen ale může být i jiný orgán, např. slezina (*peliosis splenis*), lymfatické uzliny, sítnice, CNS a ledviny. Většina pacientů má dlouhodobé až trvalé příznaky [18].

**Kožní bartonelové infekce.** K nejzávažnějším patří bacilární angiomatóza (BA, jinak také nazývána epiteloidní angiomatóza). Je to častá infekce kůže a viscerálních orgánů, prokázána zejména u imunokompromitovaných pacientů s HIV nebo u pacientů s imunosupresivní terapií.

## 1.5 Symptomy a patologie onemocnění

### 1.5.1 Symptomy a patologie extrakutánních infekcí

V místě poranění (škrábnutí, pokousání) se vytvoří primární kožní papula nebo vřídek přibližně 3 až 10 dnů od kontaktu se zvířetem (nejčastěji kočka), což může trvat 1-3 týdny, viz **Obrázek č. 4**. Přibližně po 1-7 týdnech se v okolí afekce objeví regionální lymfadenopatie (nejpostiženější je hlava, krk a horní končetiny). Typicky je postižena jenom jedna uzlina, může být postiženo i více uzlin na jedné straně nebo na různých místech. U 10% pacientů může vzniknout hnisavá lymfadenitida. Lymfadenopatie přetrvává 2-4 měsíce, může však trvat i podstatně déle. Histopatologie uzlů odhaluje směs nespecifické zánětlivé reakce, včetně granulomů a nekrózy. Komplikace této infekce se může projevit několik dní trvající horečkou, malátností, únavou, bolestmi hlavy, bolestmi v krku, vyrážkou, artropatiemi (artralgie nebo artritida) středních a velkých kloubů, zánětem šlach, neuralgií, osteomyelitidou, granulomatózní hepatitidou, atypickými pneumoniemi a encefalopatií. Objevuje se i zánět sítnice, projevující se náhlou ztrátou zrakové ostrosti. Z laboratorních parametrů to může být mírná leukocytóza s vyššími neutrofily a zvýšená sedimentace. Byly prokázány i další



komplikace, jako hepatosplenomegalie nebo kostní léze, které se mohou objevit u 5% pacientů, zejména u dětí. Méně častou manifestací onemocnění je Parinaudův syndrom, projevující se okuloglandulárním syndromem, encefalopatií, systémovým onemocněním, erythema nodosum (kožní léze), atypickými pneumoniemi, nádorem prsu a trombocytopenickou purpurou. Obvykle dochází ke spontánnímu uzdravení pacientů [2, 3, 9, 10].

K dalším extrakutánním infekcím patří *peliosis hepatis*, nebo také jinak bacilární pelióza, což je vzácné onemocnění, při kterém se v játrech tvoří krví vyplněné dutiny [11]. Endokarditidy způsobené bartonelami jsou potenciálně letální infekce, vyznačující se subakutním vývojem se závažnými lézemi a kalcifikacemi na srdečních chlopních. Bartonelové endokarditidy mají vysokou míru úmrtnosti. U 50% pacientů byly však prokázány i jiné dřívější vady chlopní. U bartonelové endokarditidy nejsou specifické příznaky. U pacientů se mohou ale objevovat potíže jako zvracení, oteklé bolestivé končetiny, petechie, průjem. Co se týče vyšetření, mají pacienti diastolický i systolický šelest. K průkazu toho, že se opravdu jedná o bartonelovou endokarditidu se pacientovi provádí biopsie srdeční chlopně a následně se provádí DNA diagnostika pomocí PCR, EIA na průkaz protilátek proti bartonelám a imunohistochemický průkaz. U některých pacientů byla bartonela prokázána v lymfatických uzlinách pomocí PCR, což naznačuje, že endokarditida může rozvinout asymptomatickou CSD nebo subklinickou chronickou lymfadenopatii. U bartonelových endokarditid je v séru detekován vysoký titr protilátek proti bartonelám, proto je pro diagnostiku kultivačně negativních endokarditid vhodné použít serologické testy [12, 17].



**Obrázek č. 4** Na obrázku jsou primární papuly, které se vytvoří po poranění kočkou [2]

### 1.5.2 Symptomy a patologie kožní bacilární angiomatózy

Bacilární angiomatóza (BA) je neovaskulární proliferace, která byla původně popsána u lidí infikovaných HIV. Typickými projevy jsou kožní a podkožní uzlíky, které mohou být i bolestivé. Na kůži se mohou objevovat kulovité papuly barvy kůže, někdy až fialové barvy. Symptomaticky se projevuje horečka, bolest hlavy, nechutenství. Histopatologie lézí prokázala rozsáhlé ulcerace a reaktivní proliferaci cév podobnou tumoru a zánětlivý infiltrát. Někdy je BA zaměňována s Kaposiho sarkomem nebo jinými cévními nádory díky podobným klinickým a histologickým projevům [2, 3, 11, 13, 14].

Při bacilární angiomatóze mohou být poškozeny ale i vnitřní orgány jako játra, slezina, kosti, mozek, plíce, střeva a děložní čípek. Příčinou BA je infekce způsobená *B. henselae* i *B. quintana*, což bylo prokázáno přímou kultivací a PCR amplifikací specifických sekvencí DNA z tkáně [2, 4].

## 2 Rod *Bartonella*

### 2.1 Morfologie a fyziologické vlastnosti

Rod *Bartonella* se vyznačuje tím, že jsou to malé (0,2-0,6 x 0,5-1  $\mu\text{m}$ ) [64], intracelulární gramnegativní, oxidáza negativní, aerobní tyčky, které patří do podskupiny  $\alpha 2$  *Alphaproteobacteria* a řádu *Rhizobiales*. Rezervoáry těchto mikroorganismů jsou domácí nebo volně žijící savci. *B. henselae* a v menší míře *B. quintana* jsou schopny určitého pohybu díky přítomnosti pilusů. Tyto pilusy se také vyznačují tím, že hrají určitou roli v buněčné adhezenci [24]. U dvou druhů, *B. bacilliformis* a *B. clarridgeiae* byly prokázány bíčíky [15].

### 2.2 Růstové a kultivační vlastnosti

Bartonely nejlépe rostou na médiích s 5% obsahem krve (králičí, ovčí, lidská, koňská) v přítomnosti 5%  $\text{CO}_2$ , i když rostou pomalu a v malých koloniích. Koňská a králičí krev je pro kultivaci mnohem vhodnější než ovčí krev. Abychom mohli na médiích bartonely detekovat, je potřeba nechat je inkubovat nejméně 7 dní. Při použití agarů obohaceného krví a prodloužené inkubaci hrozí nebezpečí kontaminace, zejména houbami. Proto může být výhodné do kultivačního média přidat amphotericin B. Nejčastěji se používá tzv. Columbia agar s přídatkem krve. Optimální inkubační teploty jsou 30°C pro *B. bacilliformis* a 37°C pro všechny ostatní druhy. Kolonie mohou mít různé tvary a různou velikost. Většinou jsou nepravidelné, drsné, bělavé, vystouplé, květákovitého nebo verukozního tvaru. Mohou být buď suché nebo vlhké konzistence. Stupeň heterogenity bakteriálních kolonií závisí na druhu. *B. henselae* se vyznačuje obvykle větším podílem drsných kolonií než *B. quintana*, která je obvykle v dalších izolacích rovnoměrně hladká [24]. Všechny druhy jsou nefermentující [15]. *B. henselae* může růst *in vitro* ve tkáňových kulturách, jako jsou endoteliální buňky a HeLa buňky [25, 26, 27]. Nicméně endoteliální buněčné kultury jsou považovány za nejúčinnější pro růst bartonel. *B. quintana* byla poprvé izolována ze vzorku od pacienta s BA pomocí kultivace kožní biopsie na linii endoteliálních bovinních buněk [25].

## 2.3 Diagnostika infekcí

### 2.3.1 Fenotypová a genotypová identifikace a typizace

#### 2.3.1.1 Fenotypová identifikace

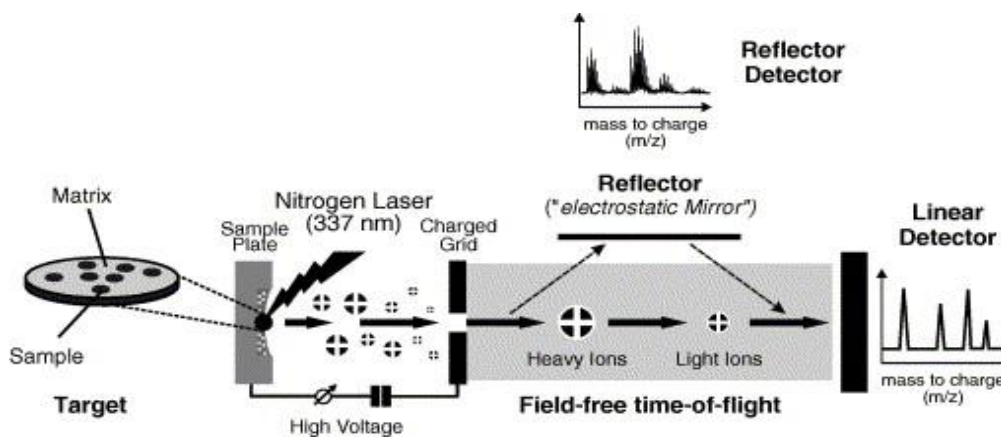
V současné době není fenotypová identifikace bartonel příliš specifická. Rod *Bartonella* je velmi obtížné kultivovat ze vzorků pacientů a většina pokusů o izolaci těchto organismů tudíž nepřináší vhodné výsledky.

##### 2.3.1.1.1 Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF)

Jednou z možných fenotypových identifikací bartonel je dnes metoda hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS). Je to metoda fyzikální, kterou řadíme mezi spektrometrické metody. Obecně principem hmotnostní spektrometrie je rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli [51]. Název zkratky pochází z anglického *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*. Dřívější způsoby ionizace a detekce umožňovaly analyzovat látky jen s nízkou molekulovou hmotností. Metoda MALDI patří mezi tzv. „měkké“ ionizační metody, což znamená, že energetický přebytek dodaný molekule je malý a proto i fragmentace primárně vzniklého iontu je malá. Vzorek, který je složený z analytu (A) smíchaného s nadbytkem matrice (M) je aplikován na kovovou tzv. MALDI destičku (**Obrázek č. 5**), a je ozařován krátkými pulsy laseru (ns). Paprsek laseru ionizuje molekuly matrice. Molekuly vzorku jsou ionizovány přenosem protonu z matrice. Dojde ke vzniku neutrálních, kladně nabitých i záporných iontů a jejich proud je poté usměrněn do analyzátoru doby letu (Time Of Flight-TOF). Jeho princip je založen na měření času, který potřebuje ion k překonání vzdálenosti mezi iontovým zdrojem a detektorem, tzv. doby letu,  $t$ . Čas je pak přepočten na hmotnost. Iontům je po ionizaci udělena stejná kinetická energie; současně vstupují do analyzátoru a měří se jejich čas dopadu na detektor [52].



**Obrázek č. 5** MALDI destička na nanášení vzorků (M. Nováková, Ústav lékařské mikrobiologie v Motole)



**Obrázek č. 6.** Schéma MALDI-TOF MS. V první části obrázku vidíme destičku se vzorkem a matricí na kterou působí pulsy laseru. Poté vznikají ionty, které procházejí přes elektricky nabitou síťku do detektoru TOF. Nakonec je zobrazeno hmotnostní spektrum testovaného mikroorganismu, které je pak srovnáno s databází známých spekter [70]

### 2.3.1.1.2 Testování citlivostí na antibiotika

Testování a následné výsledky citlivostí na antibiotika u bartonel jsou důležitými předpoklady cílené léčby konkrétního pacienta. Podobně jak je tomu u ostatních bakterií, však metody k testování nejsou standardizované. Důvodem je zejména jejich pomalý růst a nemožnost tak vyhodnotit standardně inhibiční zóny. Ve studii Maurina a kol. bylo zjištěno že, *B. henselae* i *B. quintana* vykazovaly podobné antibiotické

citlivosti. Kmeny byly velmi citlivé na většinu antibiotik ze skupiny beta-laktamů, kam patří peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a penemy, dále na aminoglykosidy, makrolidy, doxycyklin a rifampin. Stanovení citlivosti se provádí na Columbia krevním agaru nebo na čokoládovém agaru. Kultivace by měla být 5-7 dní. Je důležité zmínit, že je velmi obtížné posoudit klinickou účinnost antibiotik, protože obsáhlejší studie, která by hodnotila léčené a neléčené pacienty dosud nebyla provedena [57, 58]. Ve studii Pendlea a kol. byla citlivost bartonel testována E-testy pro vankomycin, propenem, erytromycin, klindamycin, tetracyklin, gentamycin, azitromycin, ciprofloxacin a rifampicin. Jako kultivační médium byl použit čokoládový agar, na který byly aplikovány suspenze bakterií o dvou stupních zákalu, a to 0,5 McFarlanda a 1 stupeň McFarlanda. Teprve po 4 dnech byl viditelný růst, nejlépe se E-test odečítal po 7 dnech kultivace. Bylo zjištěno, že všechny použité referenční kmeny a izoláty byly citlivé na všechna ATB, kromě vankomycinu a klindamycinu [59].

### **2.3.1.2 Genotypová identifikace**

Nejčastěji využívanou metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR), která slouží ke zmnožení specifických úseků DNA. Využívá procesů denaturace, hybridizace a syntézy DNA. Abychom mohli amplifikovat určitou část genomu, potřebujeme k tomu dva malé úseky DNA, které jsou komplementární k jejím koncovým oblastem. Tyto malé úseky se nazývají primery a jsou tvořeny většinou 20-25 nukleotidy. V PCR reakci je důležité, aby cílové sekvence, s nimiž primery hybridizují byly specifické jen pro vyšetřovanou oblast a nenacházely se na jiných místech genomu. Dále potřebujeme do reakce DNA-polymerázu a deoxyribinukleotidtrifosfáty (dNTP). Reakce probíhá v přístroji zvaném cyckler, do kterého se vkládají mikrozkušavky se směsí vyšetřované DNA, primerů, DNA-polymerázy a dNTP. Reakce probíhá ve třech základních krocích, které se liší hlavně použitou teplotou. V prvním kroku dojde k denuraci DNA působením zvýšené teploty, která je 92-96°C. Druhým krokem je navázání primerů na cílové sekvence vyšetřované DNA. Tento krok probíhá při teplotě 45-65°C. A v posledním kroku dochází k prodlužování neboli elongaci nukleotidových řetězců pomocí DNA-polymerázy při teplotě 72°C. Všechny tyto kroky představují první cyklus PCR, což k amplifikaci vyšetřované DNA nestačí a proto se obvykle provádí 20-40 na sebe navazujících cyklů [55].

Gen pro 16S rRNA, 16S – 23S mezigenová oblast a gen pro citrát syntázu byli fragmenty DNA, na nichž byly zahájeny studie zaměřené na rozvoj testů pro diagnostiku bartonelových infekcí založených na PCR. Geny na které se nejvíce diagnostika zaměřuje jsou gen pro citrát syntázu (*gltA*), protein tepelného šoku (*groEL*), gen pro riboflavinovou syntázu (*ribC*), protein buněčného dělení (*ftsZ*) a antigen o velikosti 17kDa [31, 32, 33, 34, 35]. Úsek mezi genem pro 16S rRNA (ITS region – *intergenic spacer region*), je užitečný jako diagnostický cíl pro detekci, určení druhů ale i pro genotypizaci bartonel [37, 38, 39]. V roce 1990, Relman a kol. byli prvními kdo navrhli specifické PCR primery pro identifikaci bartonel založené na unikátních oblastech na genu pro 16S rRNA. Tyto primery byly použity k amplifikaci 280 bp dlouhého fragmentu genu *B. henselae* z klinického materiálu pacientů s BA. Primery p24E a p12B byly poté úspěšně použity v jiných studiích pro amplifikaci genu pro 16S rRNA u jiných druhů bartonel. Tyto primery nejsou nicméně rodově specifické a lze tak s nimi amplifikovat fragmenty genů pro 16S rRNA i z jiných druhů bakterií podskupiny  $\alpha 2$  řádu *Proteobacteria*. Amplifikaci fragmentu o vhodné velikosti pomocí PCR nelze považovat za důkaz přítomnosti bartonelové DNA, a PCR musí být dále charakterizována, nejučinněji sekvenováním, hybridizací nebo restrikční analýzou. Principem restrikční analýzy je, že DNA o známé velikosti se pomocí restrikčního enzymu (např. *TaqI*) specificky štěpí na fragmenty DNA o známé velikosti, čemuž říkáme restrikční profil. Amplifikace fragmentů genu pro citrát syntázu, společně s RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polymorfismus délky restrikčních fragmentů), byla poprvé popsána pro detekci a identifikaci rickettsií a tento systém byl později rozšířen na bývalý druh *Rochalimaea*, resp. *Bartonella*. Primery použité při amplifikaci nejsou specifické pro bartonely, ačkoli RFLP z produktů amplifikace umožňují rozlišení jednotlivých bartonel [36, 28, 29, 26, 30].

### 2.3.1.3 Genotypová klonální analýza (typizace)

Díky velké genetické rozmanitosti bartonel se používá molekulární metoda real-time PCR. Molekulární metody musí být použitelné pro různé druhy klinického materiálu jako je hmyz, krev nebo tkáň [20]. Citlivost PCR je závislá na cílových genech a na skupině pacientů. Hlavní nevýhodou PCR je nutnost získat invazivní vzorky jako hnis nebo jinou tkáň. Nedávné studie ukázaly složitější klasifikaci *B.henselae*. Jsou dva *B. henselae* 16S rRNA genotypy, spojené s případy *cat scratch disease*. Genotyp I (odpovídající sérotypu Houston – 1) a genotyp II (sérotyp Marseille). Po objevu genotypu II, Drancourt a kol. naznačují, že tento genotyp může mít vliv na přesnost serologických testů. Sérotyp Marseille je dominantní u koček ve Spojených Státech Amerických, v Evropě a Austrálii, Houston-1 sérotyp je častější v Asii. V nedávné studii byla použita metoda MLST (*Multilocus Sequence Typing*), kdy byla DNA extrahována pomocí QIAamp DNA Mini Kitu, a je zde známo 9 genetických lokusů (16S rRNA, *[rrs]*, *batR*, *gltA*, *groEL*, *ftsZ*, *nlpD*, *ribC*, *rpoB*, and *eno*) Tyto nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí DNASTAR Lasergene softwaru 7 (DNASTAR, Madison, USA). Nové alely byly analyzovány re-sekvenováním [21, 22, 23].

**Makrorestrikční analýza** DNA pomocí pulzní elektroforézy (*Pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE) je vhodný způsob pro intra- a interdruhovou identifikaci bartonel. Jedná se o štěpení restrikčními enzymy *SmaI* a *EagI*, které je prokázáno u *B.henselae*, *B. quintana*, *B. elizabethae* a *B. vinsonii* [45, 46]. Metoda je používána pro separaci velkých molekul DNA s použitím pulzního elektrického pole. Nejdříve se však čistá kultura testovaného mikroorganismu smíchá se speciální agarózou (aby nedocházelo k defragmentaci velkých kusů DNA), ve které dále probíhá lýza buněk, jejich deproteinizace a štěpení pomocí *rare cutting* restriktazy. Místo neustále běžícího napětí v jednom směru, se používá napětí, které je přepínáno mezi třemi různými směry. Jeden směr prochází ve středové ose gelu a zbylé dva jsou v úhlu 60° na každé straně. Výsledkem je několik fragmenů velikých až několik stovek kb, kterému říkáme restrikční profil chromozomální DNA. Metoda je zejména vhodná na porovnání klinických kmenů izolovaných v krátkém časovém období.

Další metodou patřící do DNA fingerprintingu jsou tzv. Rep-PCR kam patří ERIC- a REP-PCR. Repetitivní PCR (Rep-PCR) jako třeba ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) –PCR a REP (*repetitive extragenic palindromic*) –PCR



jsou užitečné metody pro identifikaci bartonel na druhové úrovni [47,48]. Dále se používá tzv. RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), kde se používá krátký (10-15 bp) libovolně zvolený primer pro amplifikaci sekvence genomové DNA pod podmínkou nízké stringence. RFLP, tzv. polymorfismus délky restrikčních enzymů je na PCR založená analýza restrikční endonukleázou DNA fragmentu včetně oblasti mezi geny pro 16S a 23S rRNA pro rozlišování mezi bartonelovými druhy a podtypy *B.henselae* [49]. Trávení ampliconů pomocí *AluI*, *HaeIII.*, *TaqI*, *HinfI* a *MseI* umožňuje druhovou diferenciaci mezi *B. henselae*, *B. quintana*, *B. vinsonii* a *B. bacilliformis*.

### 2.3.2 Serologie

Přes více než 30 let, se diagnóza CSD spoléhala na klinická kritéria a kožní test, ale jednoduchost serologie je předčila a je nyní prvním krokem v diagnostice CSD. Provádí se nepřímá imunofluorescence (IFA) a ELISA na průkaz specifických IgM a IgG protilátek proti *B. henselae* v séru. Přestože IFA je metoda používaná nejčastěji, je ale časově náročnější než ELISA a výsledky by mohly být méně objektivní [21]. Je nutné poznamenat, že u většiny pacientů infikovaných HIV, obzvláště u pacientů náchylných na infekce vyvolané *B. henselae*, se nevyskytuje významná protilátková odpověď proti infekci. Naproti tomu, bylo zjištěno, že specifické protilátky proti *B.henselae* v séru pacientů s CSD tvoří až 88% případů při použití metody IFA a 95% při použití ELISA metody. Odlišné výsledky titrů detekovaných protilátek může ovlivnit použití odlišných antigenů. Genetická heterogenita *B. henselae* byla zaznamenána v průběhu předběžné charakterizace druhů, a následně byly pozorovány genotypové a fenotypové rozdíly u *B. henselae* izolované z kočičí krve. Drancourt a kol. charakterizovali nové kmeny *B. henselae* z francouzských pacientů s endokarditidou a CSD, a koček z Anglie a Švýcarska, a zjistili mezi nimi významné rozdíly. Názor na specifitu protilátkových testů byl zpochybnován. Současná metoda nepřímé imunofluorescence nerozlišuje protilátky proti *B. henselae* a proti *B. quintana*. Jsou popsány zkřížené reaktivity mezi bartonelami a jinými organismy, jako je *Coxiella burnetii* a *Chlamydie*. Tyto zkřížené reaktivity byly potvrzeny pomocí imunoblotu. Citlivost zkříženě reaktivních antigenů k proteináze K ukazuje jejich bílkovinnou povahu. Zkřížená reaktivita mezi bartonelami, chlamydiemi a *C. burnetii* je diagnosticky velmi významná, protože všichni tito původci mohou způsobovat

endokarditidu. Avšak vzhledem k tomu, že hladiny specifických protilátek u endokarditid vyvolaných bartonelou jsou extrémně vysoké, a u jiných antigenů jsou velmi malé zkřížené reakce, nemělo by to vést k chybné diagnóze [40, 41, 22, 42, 26, 4, 43, 44].

**B. quintana.** Enzymová imunoanalýza (EIA) a radioimunoprecipitace srovnatelně prokázaly, že co se týče citlivosti jsou tyto dvě metody lepší ve srovnání s hemaglutinací nebo metodou IFA. Dokážou totiž detekovat i malá množství protilátek proti *B. quintana* u pacientů se zákopovou horečkou [24].

**B. henselae.** Výsledky imunofluorescenčního testu a EIA pro identifikaci *B. henselae* mají mezi sebou a kožním testem dobrou korelaci při vyšetřování CSD. Vzhledem k tomu, že není k dispozici komerční nebo standardizovaný kožní test, protože nese jisté riziko přenosu infekce (připravuje se z hnisu z lymfatických uzlin), a není tak specifický a citlivý jako PCR a serologie, se nahrazuje serologickým testováním [24].

### 3 CÍL

Hlavním cílem této bakalářské práce je zavést fenotypové a genotypové metody pro diagnostiku bartonelových infekcí způsobených *B. henselae* a *B. quintana* a zpracování literární rešerše zabývající se tímto rodem bakterií a problematikou s ním spojenou.

## 4 MATERIÁL

### 4.1 Referenční kmeny

Druh	Sbírka
<i>B. quintana</i>	CIP 103739
<i>B. henselae</i> Houston	ATCC 49882 <sup>T</sup>

**Tabulka č. 1** Referenční kmeny rodu *Bartonella*

Vysvětlivky: CIP - *The Collection of Institut Pasteur*, Paříž, Francie, ATCC - *American Type Culture Collection*, Manassas, USA

### 4.2 Klinické izoláty a vzorek

Druh	Číslo izolátu
<i>B. henselae</i>	C1
<i>B. henselae</i>	C4
<i>B. henselae</i>	C26
<i>B. henselae</i>	C27
vzorek z biopsie	pacientka OL, nar. 1970

**Tabulka č. 2** Klinické izoláty *B. henselae* [66]. Označení izolátů písmenem C je převzato ze studie MVDr. Ota Meltera, Ph.D. kde byly vyšetřované vzorky takto označeny. Písmeno C pro označení vzorků je z anglického slova *cat*. Kmeny C1 a C26 byly kontaminované a ani po opakovaných izolacích a ověřování pomocí fenotypových a genotypových metod se nám nepodařilo získat čistou kulturu a proto jsme kmeny vyřadili z této studie.

Vzorek kožní biopsie z nodulární léze od pacientky (nar. 1970) po transplantaci ledviny se suspektní bacilární angiomatózou ve Fakultní nemocnici v Olomouci. Pacientka měla v anamnéze asi 4 týdny trvající tvorbu živě červených nodulací až verukozit difúzně po těle. Byla nasazena antibiotická léčba Amoksiklavem, po které nastala regrese potíží.

### **4.3 Kultivační půdy**

- Plotny s Columbia krevním agarem (5% beraní krve) – Oxoid, Basingstoke, UK
- Plotny s Columbia krevním agarem s 5% beraní krve – připraveno na Ústavu lékařské mikrobiologie, do 10 cm Petriho misek rozplňováno po 30 ml
- Čokoládový agar - Oxoid, Basingstoke, UK

### **4.4 Chemikálie a diagnostika**

- Peroxid vodíku pro katalázový test (3%) COOPHARMA s.r.o., ČR
- ITEST Oxidáza – ITEST s.r.o., ČR

### **4.5 Roztoky**

#### **4.5.1 Gramovo barvení**

- Krystalová violet, ředění 1:4 – Test line, ČR
- Lugolův roztok – Test line, ČR
- Aceton – Ing. Petr Švec – PENTA, ČR
- Karbofuchsin, ředění 1:10 – Test line, ČR

## 4.6 Materiál pro pulzní elektroforézu

### 4.6.1 Roztoky pro pulzní elektroforézu (PFGE)

Všechny chemikálie na přípravu pufrů a proteinázy K od Sigma, Německo

- 1 M Tris pH 8,0
- 0,5 M EDTA pH 8,0
- PIV: Tris + NaCl + DH<sub>2</sub>O
- EC roztok: Tris + NaCl
- ES: EDTA + N-Lauroyl-sarcosine + DH<sub>2</sub>O
- ESP: ES + Proteinasa K
- TE: Tris + EDTA + DH<sub>2</sub>O
- Restrikční enzym *SmaI* (NEB, USA)
- *Low melting point agarosa*

### 4.6.2 Gel pro pulzní elektroforézu

- TBE pufr 50%, pH 8,3
- Agarosa – Serva, Germany
- Ethidium bromid – Sigma, USA

## 4.7 Materiál pro PCR

### 4.7.1 Chemikálie pro přípravu PCR

- *Amplicor Respiratory Specimen Preparation kit* pro izolaci DNA, Roche, Německo
- PPP master mix – TOP BIO s.r.o., ČR
- PCR H<sub>2</sub>O – TOP BIO s.r.o., ČR

## 4.7.2 Primery

Použité primery byly vybrány na základě informací uvedených v odborných publikacích.

Primer	Gen	Sekvence	T <sub>m</sub> (°C)
RpCS877p	gltA	5'-GGG GGC CTG CTC ACG GCG G-3'	48
RpCS1258n	gltA	5'-ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A-3'	48
PBH-L1	ribC	5'-GAT ATC GGT TGT GTT GAA GA-3'	55,5
PBH-R1	ribC	5'-AAT AAA AGG TAT AAA ACG GCT-3'	55,5
PBQ-R1	ribC	5'-AAA GGG CGT GAA TTT TG-3'	59,8
BH-F	ftsZ	5'-GCC GCA AAG TTC TTT TCA TG-3'	60,5
BH-R	ftsZ	5'-AGG TGA ACG CGC TTG TAT TTG-3'	60,5
BQ-F	ftsZ	5'-GTC TCA GAC TTC TTT TCA TC-3'	55,5
BQ-R	ftsZ	5'-GAG CCC GCA TCT GTT GCA TTT CCT-3'	55,5

Tabulka č. 3 Primery použité v PCR reakcích [53, 54].

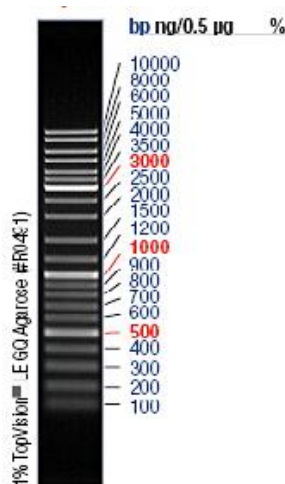
## 4.8 Materiál pro přípravu elektroforézy

### 4.8.1 Agarózový gel pro elektroforézu

- TBE pufr 50%, pH 8,3
- Agarosa – Serva, Germany
- Ethidium bromid – Sigma, USA

### 4.8.2 DNA marker

- *O'Gene Ruler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix* - Fermentas, Litva



Obrázek č. 7 Vzhled a velikost DNA markeru

## 4.9 Antibiotika

- E-test vankomycin (MIC 0,016-256µg/ml) – BIODISK, Sweden
- E-test imipenem (MIC 0,002-32µg/ml) – BIODISK, Sweden
- E-test minocyclin (MIC 0,016-256µg/ml) – BIODISK, Sweden
- E-test erytromycin (MIC 0,015-256µg/ml) – OXOID, UK
- Disková difuzní citlivost ampicilin/sulbaktam (20 µg), kotrimoxazol (25 µg), kolistin (10 µg), gentamicin (10 µg), netilmicin (10 µg), tobramycin (10 µg), piperacilin/tazobactam (36 µg), ceftazidim (10 µg), amikacin (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), ofloxacin (5 µg), cefepim (30 µg), cefoperazon/sulbaktam (105 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), tigecyklin (15 µg) (OXOID)

## 4.10 Použité přístroje

- Analytické váhy – AND, Japonsko
- Centrifuga – Mini spin plus, Eppendorf, Německo
- Centrifuga – Multi-Spin MSC-6000, BIOSAN
- Vortex – MS2 Minishaker, IKA
- Termocyclyer – Thermal Cycler GenePro, BIOER, USA
- Mikrovlnná trouba – Whirlpool M504. Whirlpool Corp., USA
- Zdroj elektrického napětí pro ELFO – Consort E835, Dynex s.r.o., ČR



- Systém pro dokumentaci a focení gelů – Kodak Gel Logic 120, Kodak, USA
- Světelný mikroskop – model CX21FS1, OLYMPUS, Japonsko
- Vodní lázeň – BIOER, USA
- Aparatura na PFGE – BIO-RAD, USA
- Termostat CO<sub>2</sub> – SANYO, Japonsko

## 5 METODY

### 5.1 Fenotypová identifikace

Předběžná fenotypová identifikace do rodu *Bartonella* byla provedena pomocí kultivace a morfologií kolonií, morfologií bakteriálních buněk barvených Gramem a testováním skriningových biochemických vlastností referenčních a klinických kmenů bartonel.

#### 5.1.1 Kultivační průkaz

Referenční kmen *B. henselae* Houston ATCC 49882<sup>T</sup>, *B. quintana* CIP 103739 a klinické izoláty *B. henselae* C1, C4, C26 a C27 byly naočkovány sterilní kličkou na plotny s Columbia krevním agarem s 5% beraní krve a na čokoládové agary dodané od dodavatele, a po dobu 5 dnů byly plotny inkubovány v termostatu při teplotě 37°C za přítomnosti CO<sub>2</sub>. Poté byly všechny kmeny znova naočkovány na Columbia agary s 5% beraní krve, připravené na Ústavu lékařské mikrobiologie v Motole. Obsah kultivační půdy v Petriho misce byl větší (30 ml), než u komerčně dodávaných půd, ve kterých nejsou čerstvé erytrocyty potřebné pro kultivaci bartonel a dochází k rychlému vysychání půdy.

#### 5.1.2 Gramovo barvení

Grampozitivní bakterie mají stěnu tvořenou proteoglykanem a polysacharidy, kterými prochází kyselina teichoová. Při barvení se krystalová violet dostává do buněk a tvoří s Lugolovým roztokem modrou komplexní barvu. Alkohol pak není schopný prostoupit stěnou a rozpustit tento komplex. Dobarvení karbolfuchsinem dodá bakteriím tmavě fialovou barvu.

Gramnegativní bakterie mají stěnu tvořenou tenkou vrstvou proteoglykanu a vrstvou lipopolysacharidu. Díky tenké vrstvě se při odbarvování alkoholem barevný komplex odbarví. Karbolfuchsin následně obarví bakterie na růžovo [60].

Barvení preparátů bylo provedeno tak, že usušené a zfixované preparáty se přelijí roztokem krystalové violeti, která se nechá působit přibližně 1 minutu. Poté se preparát opláchnou vodou. Dalším krokem je přelití Lugolovým roztokem (cca 1 min) a znovu opláchnutí vodou. Poté se do odbarvení přelívají preparáty alkoholem, opláchnou vodou a přelijí karbolfuchsinem, který necháme působit přibližně 1 minutu. Po uplynutí doby se preparáty znovu opláchnou vodou, usuší filtračním papírem a mikroskopují s použitím imerzního oleje.

### 5.1.3 Biochemické vlastnosti

Z biochemických vlastností bartonel se provedl katalázový test, kdy se do zkumavky nalije roztok peroxidu vodíku a pomocí sterilní kličky, na kterou nabereme narostlou biomasu bakterií, se ponoří do peroxidu, a podle toho zda se tvoří či netvoří bublinky, můžeme určit zda je daná bakterie kataláza pozitivní či negativní. Oxidázový test bývá u bartonel rovněž negativní.

### 5.1.4 Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF)

Na identifikaci byla použita metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Byla použita bakteriální kultura z typových kmenů *B. henselae* Houston ATCC 49882<sup>T</sup> a *B. quintana* CIP 103739 po 5 denní kultivaci na Columbia krevních agaroch vylytých na Ústavu lékařské mikrobiologie. Kultura se po opracování nanese na kovovou destičku a provede identifikace standardním postupem (viz kapitola 2.3.1.1.1).

## 5.2 Genotypová identifikace

### 5.2.1 Izolace DNA

K izolaci DNA typových kmenů *B. henselae* Houston, *B. quintana* a klinických izolátů *B. henselae* C4 a C27 byl použit extrakční kit *Amplicor Respiratory Specimen Preparation Kit*. Pro izolaci DNA se v tomto kitu používají následující roztoky:

*Respiratory Specimen Wash Sol (RW)*, *Respiratory Specimen Lysis Reagent (RL)* a *Respiratory Specimen Neutralization Reagent (RN)*.

K izolaci DNA jsme použili kolonie narostlé na Columbia krevním agaru při 37°C. Pomocí sterilní kličky byly kolonie smíchány se 100µl fyziologického roztoku v mikrozkuhavce a zamíchány na vortexu. Poté se přidáním 500µl roztoku RW a centrifugováním 10 min při 13 000 ot./min promyly bakteriální buňky. Po centrifugaci se odstranil supernatant vylitím, a aby bylo zajištěno odstranění přebytečné tekutiny, zkuhavky se postaví dnem vzhůru na buničinu a přibližně minutu se nechají odkapat. Do mikrozkuhavky se přidalo 100µl roztoku RL a po zvortexování se vzorky daly na 45 minut temperovat do termobloku nastaveném na 60°C. Po krátkém stočení na centrifuze (cca 10s) bylo přidáno 100µl roztoku RN, vzorek byl zvortexován a tím izolace DNA hotová. DNA byla uložena do lednice pro další zpracování.

### **5.2.2 Amplifikace rodově (*gltA*) a druhově (*ribC*, *ftsZ*) specifických genů**

Genotypová identifikace byla provedena amplifikací genů *gltA*, *ribC* a *ftsZ*. Nejprve byla provedena optimalizace PCR pro určení optimální teploty amplifikace. V **Tabulce č. 3** jsou uvedeny všechny použité primery i s jejich teplotami tání ( $T_m$ ). Jako standard byl použit O'GeneRuller™ Ladder Mix od Fermentas. Jako negativní kontrolu jsme použili pouze PPP master mix a vodu pro PCR. Amplikon genu pro citrát syntázu (*gltA*) o velikosti 379 bp se po amplifikaci štěpil za účelem získání specifického restrikčního profilu pro *B. henselae* (171, 137 a 71 bp) a *B. quintana* (316 a 63 bp).

### **5.2.3 Elektroforéza na agarózovém gelu**

Vzorky amplifikované DNA se pipetují do jamek vzniklých v agarózovém gelu. Nejčastěji se používá 1% agarózový gel [55].

Gel byl připraven tak, že se na analytických vahách navážilo 0,3 g agarózy a přidala do 30 ml TBE pufru, který má pH 8,3 a rozpustila v mikrovlnné troubě. Po uvaření se do gelu přidá 1µl ethidium bromidu pro obarvení fragmentů DNA. Gel se nalije do připravené formy, ve které jsou hřebeny pro vytvoření potřebných jamek na pipetování. Vytvořený gel se pak umístí do elektroforetické vany, která je připojena ke zdroji

stejnoseměrného proudu. Do 1. jamky se napipetuje 1  $\mu$ l markeru, jehož délka je 100-10 000 bp. Do dalších jamek se pipetuje po 9  $\mu$ l vzorku. Poté se spustí aparatura a ELFO trvá přibližně 20 minut při napětí 100V. Záporně nabitě fragmenty DNA jsou přitahovány ke kladné elektrodě. Po elektroforéze se výsledky prohlížely pod UV lampou a dokumentovali pomocí speciálního fotografického programu.

#### 5.2.4 PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Gelová pulzní elektroforéza je metoda používaná pro separaci velkých molekul DNA s použitím pulzního elektrického pole.

Na Columbia krevních agaroch byly kultivovány referenční kmen *B. henselae* Houston a klinické izoláty *B. henselae* C4 a C27 po dobu 5 dnů ve 37°C za přístupu CO<sub>2</sub> pro dostatečné množství bakteriální kultury, která byla použita na přípravu agarových disků. Kultura se pomocí sterilní kličky nabere a přenesení do čisté mikrozkušavky a přidá se PIV roztok pro jejich resuspendaci. Poté směs zcentrifugujeme, odstraníme supernatant, znovu přidáme PIV roztok a opakujeme resuspendaci. Po druhé resuspendaci se z každé zkumavky odebere 200  $\mu$ l do čistých mikrozkušavek a změří se na ELISA readeru optická denzita. Podle získaných hodnot se vzorky naředí podle vzorce  $(40 \times OD \times 210) - 210 = \text{objem PIV}$ . 150  $\mu$ l takto naředěných vzorků se dají inkubovat do vodní lázně při 42°C na 10 minut. Ke každému vzorku se přidá 1,5% agaróza s nízkým stupněm tání (*low melting point agarosa*), dobře promíchá na vortexu a dá se zpět do vodní lázně. Aliquoty (20  $\mu$ l) DNA se kapaly na podložní skleněné desky a překryly krycím sklíčkem, které se umístí na 20 minut do lednice aby vytvořené disky agarózy s DNA dobře ztuhly. Do plastové zkumavky se nepipetuje 1ml EC lyzujícího roztoku a pomocí sterilní kličky se do ní přenesení gelový disk a po dobu 5 hodin se inkubuje ve vodní lázni při 37°C, kdy bakteriální buňky lyzují. V dalším kroku se provádí deproteinizace inkubací disku DNA s proteinázou K. Následně se štepí chromozomální DNA pomocí restriktázy *Sma*I a nakládá do gelu a za specifických podmínek (21h, 1,5-15sek, 6V, 14°C) se fragmenty DNA rozdělí do specifického profilu pro jednotlivé pulzotypy.

## 5.3 Stanovení citlivosti k antibiotikům

K empirické antibiotické léčbě je nutná správná diagnostika bartonelových infekcí. Nejlepší možností by však byla jejich cílená terapie, bartonelové kmeny jsou však kultivačně prokázány z klinického materiálu zcela výjimečně a jejich testování není, díky dlouhodobému růstu bartonel, standardizováno. Testy ke stanovení rezistence bakterií k antibiotikům dělíme na kvantitativní a kvalitativní. Ke kvalitativním testům patří diskový difúzní test (DDT). Tento test nám určí konkrétní antibiotika, na která je bakterie rezistentní nebo citlivá. Mezi kvantitativní testy patří mikrodiluční test, ve kterém zjišťujeme tzv. MIC (minimální inhibiční koncentrace). Poté existují také testy, které kombinují jak kvalitativní tak kvantitativní testování citlivosti k antibiotikům. Tento test se nazývá E-test [56].

### 5.3.1 Diskový difúzní test

Základem této metody je difúze antibiotik z antibiotických disků do agarů s bakteriálním inokulem o hustotě 0,5-1 McFarlanda. Z důvodu, že z takového inokula testované kmeny bartonel nerostly se alternativně použila hustě naočkovaná bakteriální kultura a po inkubaci se vytvořily inhibiční zóny, což jsou vlastně zóny kolem antibiotických disků, kde již bakterie nerostou. Po naočkování bakterií se plotny dají inkubovat do 37°C po dobu 18-24 hodin.

V této práci byl použit místo Mueller-Hintonova agarů, čokoládový agar připravovaný přímo na Ústavu lékařské mikrobiologie. Na čokoládový agar byly naočkovány referenční kmeny *B. henselae* Houston, *B. quintana* a klinické izoláty *B. henselae* (C4 a C27), aplikovány disky s antibiotiky a plotny byly inkubovány ve 37°C za přítomnosti CO<sub>2</sub> a po 7 dnech byly odečítány inhibiční zóny.

### 5.3.2 E-test

E-test patří mezi kvantitativní difúzní metody. Na hustě naočkovanou plotnu se položí proužky, na kterých jsou od sebe oddělena místa s postupně klesající koncentrací antibiotika. Tato metoda je poměrně drahá, proto se pro rutinní použití příliš nevyužívá.

V této práci byly použity E-testy s tobramycinem, imipenemem, minocyklinem a erytromycinem. Rozmezí MIC u testovaných antibiotik uvádí **Tabulka č. 4**.

<b>ATB</b>	<b>MIC (µg/ml)</b>
tobramycin	0,016 - 256
imipenem	0,002 - 32
minocyklin	0,016 - 256
erytromycin	0,015 - 256

**Tabulka č. 4** Rozmezí MIC E-testů

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Fenotypová identifikace

#### 6.1.1 Kultivační průkaz

Referenční kmeny i klinické izoláty byly kultivovány na Columbia krevních agaroch při teplotě 37°C za přítomnosti CO<sub>2</sub> po dobu 5 dnů. Morfologicky jsou kolonie u referenčních kmenů hladké (S fáze), s rovnoměrným okrajem, bělavé až průhledné barvy. Kolonie klinických izolátů jsou drobné, lesklé, průhledné.



**Obrázek č. 8** Typový kmen *B. henselae* Houston ATCC 49882<sup>T</sup>



**Obrázek č. 9** Klinický izolát *B. henselae* C4





**Obrázek č. 10** Klinický izolát *B. henselae* C27

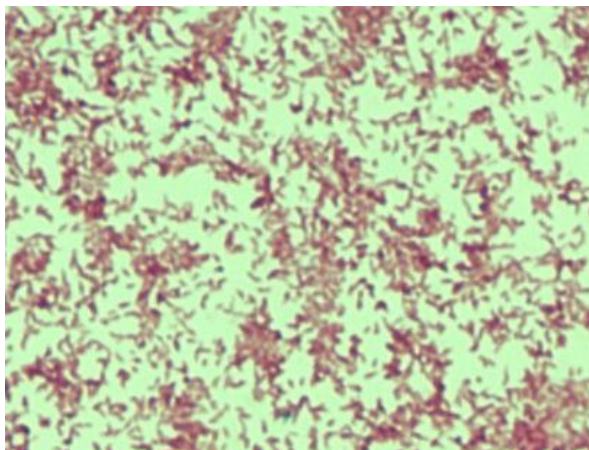


**Obrázek č. 11** Typový kmen *B. quintana* CIP 103739

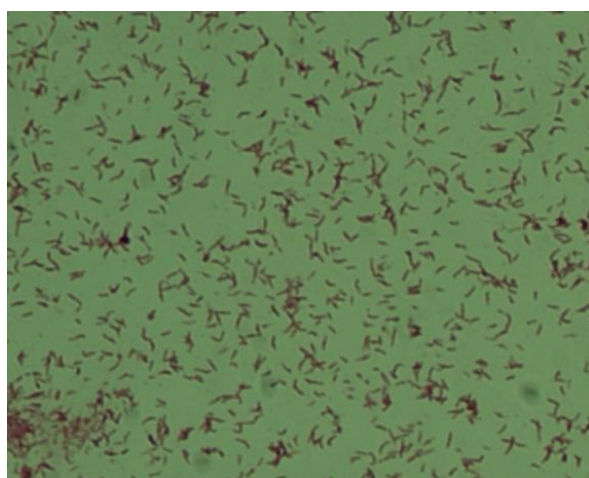
### 6.1.2 Gramovo barvení

Preparáty referenčních kmenů *B. henselae* Houston, *B. quintana* a klinických izolátů *B. henselae* C4 a C27 byly obarveny Gramovým barvením.

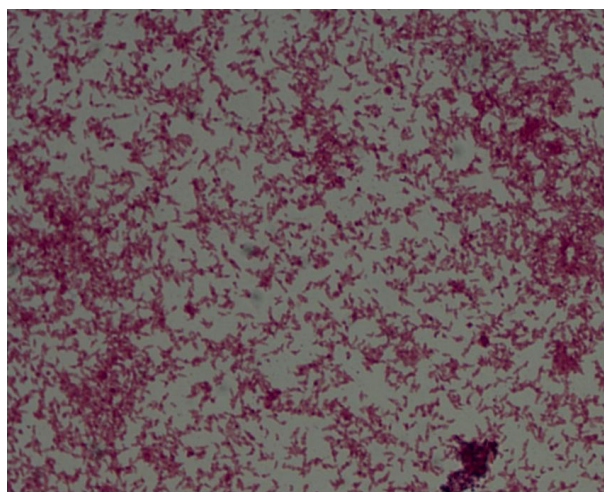
Mikroskopie preparátů potvrdila, že bakterie jsou gramnegativní a jsou to velmi drobné tyčinky, které často vytváří shluky. Tyto vlastnosti však nejsou rodově ani druhově specifické.



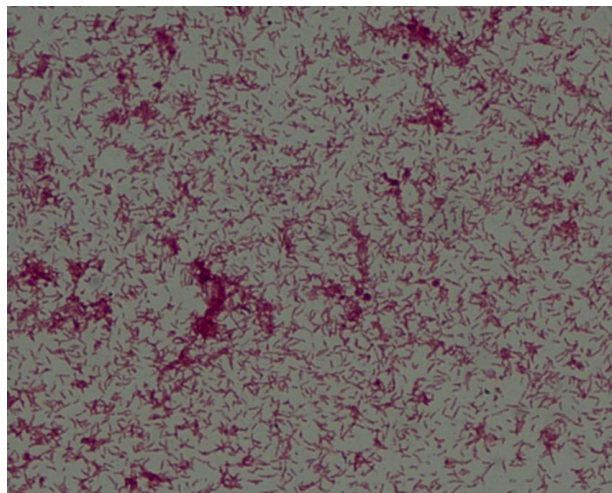
**Obrázek č. 12** *B. quintana* CIP 103739



**Obrázek č. 13** *B. henselae* Houston ATCC 49882<sup>T</sup>



**Obrázek č. 14** *B. henselae* – klinický izolát C4



**Obrázek č. 15** *B. henselae* - klinický izolát C27

### 6.1.3 Biochemické vlastnosti

Z biochemických vlastností byl proveden katalázový test na průkaz oxidázy (ITEST) pomocí peroxidu vodíku. Žádný z kmenů netvořil ve zkumavce bublinky O<sub>2</sub>. Bartonely jsou proto kataláza negativní. Také byl proveden oxidázový test, který byl rovněž u všech testovaných kmenů negativní. Bartonely, na rozdíl od většiny klinicky významných bakterií, jsou biochemicky inertní a proto jejich biochemickou aktivitu nelze testovat pomocí žádné ze známých diagnostických souprav nebo zkumavkových testů.

### 6.1.4 Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF)

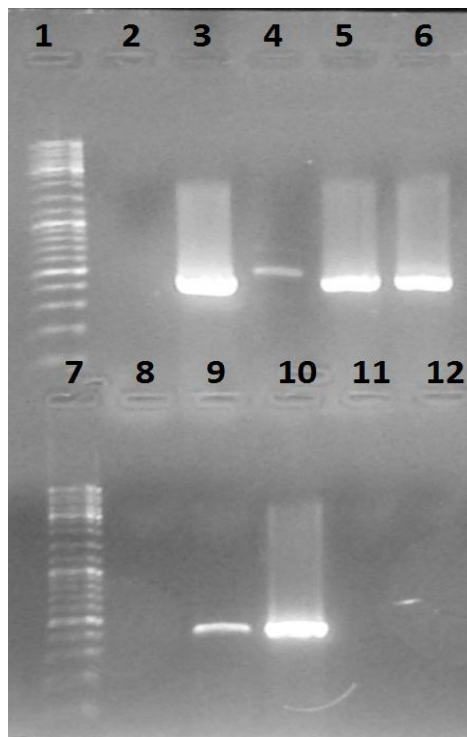
Z důvodu toho, že přístroj MALDI na Ústavu lékařské mikrobiologie nemá v databázi žádný druh bartonel, jak jsme předpokládali, byla identifikace neúspěšná.

## 6.2 Genotypová identifikace

Genotypová identifikace byla provedena amplifikací genů *ribC*, *gltA* a *ftsZ* pomocí PCR. Pro druhové určení *B. henselae* pomocí amplifikace genu *ribC* byly použity primery PBH-L1, PBH-R1 a pro *B. quintana* PBH-L1 a PBQ-R1. Pro amplifikaci genu *gltA* byly použity primery RpCS877p a RpCS1258n. A pro druhové určení *B. henselae* pomocí amplifikace genu *ftsZ* byly použity primery BH-F, BH-R a

pro *B. quintana* BQ-F a BQ-R. Amplifikace genů *ribC* a *ftsZ* byla provedena u vzorků typových kmenů *B. henselae* Houston (ATCC 49882<sup>T</sup>) a *B. quintana* (CIP 103739) a klinických izolátů *B. henselae* C4 a C27.

Výsledky elektroforézy (**Obrázek č. 16**) ukazují, že amplifikace genu *ribC* se specifickými primery pro *B. henselae* (PBH-L1 a PBH-R1) proběhla u všech testovaných kmenů včetně *B. quintana*. Amplifikace genu *ribC* *B. quintana* (PBH-L1 a PBQ-R1) proběhla u typových kmenů, jak u *B. quintana*, tak u *B. henselae*. Výsledky ukazují, že použití primerů PBH-L1, PBH-R1 a PBQ-R1 pro gen *ribC* nemusí být dostatečně specifické pro odlišení vzorků *B. henselae* a *B. quintana*.



**Obrázek č. 16** Amplifikace genu *ribC* u *B. henselae* Houston, *B. quintana*, *B. henselae* C4 a *B. henselae* C27 pomocí primerů PBH-L1, PBH-R1 a PBQ-R1.

Horní řada: PCR průkaz genu *ribC* *B. henselae*, primery PBH-L1 a PBH-R1, T<sub>m</sub> 55,8°C

1. Marker, 2. negativní kontrola, 3. *B. henselae* Houston, 4. *B. quintana*,

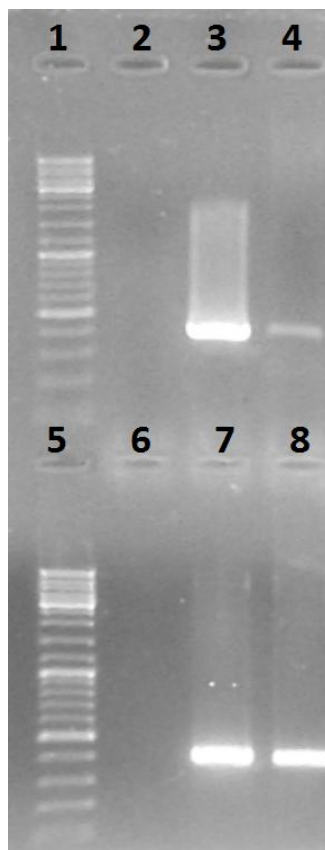
5. *B. henselae* C4, 6. *B. henselae* C27

Dolní řada: PCR průkaz genu *ribC* *B. quintana*, primery PBH-L1 a PBQ-R1, T<sub>m</sub> 59,8°C

7. marker, 8. negativní kontrola, 9. *B. henselae* Houston, 10. *B. quintana*,

11. *B. henselae* C4, 12. *B. henselae* C27

Gen *ribC* byl také amplifikován z klinického materiálu od pacientky s podezřením na bartonelovou infekci (BA). Amplifikace byla provedena se specifickými primery jak pro *B. henselae*, tak pro *B. quintana*. Amplifikace proběhla v obou případech, a tudíž nebylo možné určit druhovou příslušnost původce infekce. (viz **Obrázek č. 17**)



**Obrázek č. 17** Amplifikace genu *ribC* u vzorku z kožní biopsie.

Horní řada: PCR průkaz genu *ribC* *B. henselae*, primery PBH-L1 a PBH-R1, Tm 55,8°C

1. Marker, 2. Negativní kontrola, 3. *B. henselae* Houston, 4. Klinický vzorek

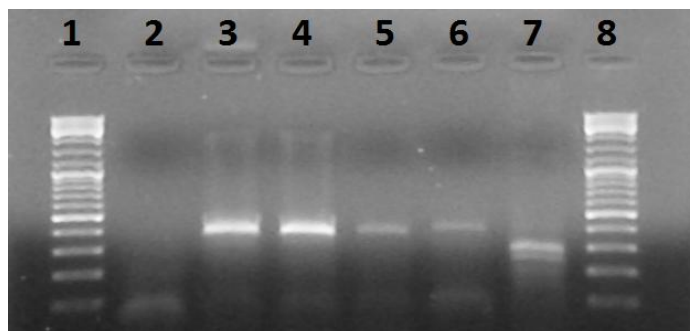
Dolní řada: PCR průkaz genu *ribC* *B. quintana*, primery PBH-L1 a PBQ-R1,

Tm 59,8°C

5. marker, 6. Negativní kontrola, 7. *B. quintana*, 8. Klinický vzorek

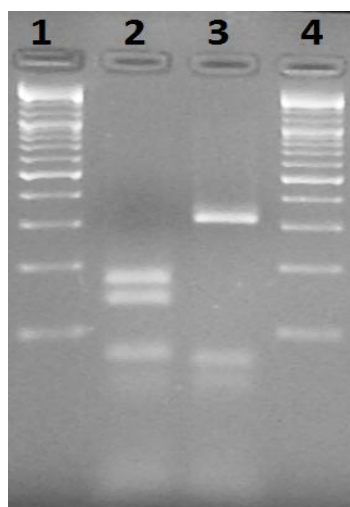
Pro průkaz genu *gltA* byly použity specifické primery RpCS877p a RpCS1258n. Samotná amplifikace genu *gltA* není dostatečná k druhovému určení Bartonel. K druhovému určení bartonel je nutné provést restriční analýzu pomocí enzymu *TaqI*. Výsledkem je, že amplifikace proběhla u všech testovaných kmenů včetně

klinického vzorku. (viz **Obrázek č. 18**) Amplikon *B. henselae* byl štěpen na tři fragmenty o velikosti 71, 137 a 171 bp a amplikon *B. quintana* byl štěpen na dva fragmenty o velikosti 316 a 63 bp. (viz **Obrázek č. 19**)



**Obrázek č.18** Amplifikace genu *gltA* *B. henselae* Houston, *B. quintana* a *B. henselae* C4 a C27

1. Marker, 2. Negativní kontrola, 3. *B. henselae* Houston, 4. *B. quintana*,
5. *B. henselae* C4, 6. *B. henselae* C27, 7. Klinický vzorek, 8. marker

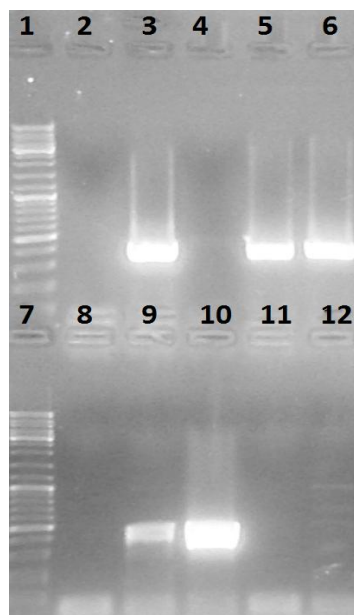


**Obrázek č. 19** Restriční profil *B. henselae* Houston a *B. quintana*.

1. Marker, 2. *B. henselae* Houston, 3. *B. quintana*, 4. Marker

Pro druhové určení bartonel pomocí amplifikace genu *ftsZ* byly použity specifické primery BH-F a BH-R pro *B. henselae* a BQ-F a BQ-R pro *B. quintana*. Amplifikace genu *ftsZ* s primery specifickými pro *B. henselae* proběhla u vzorků *B. henselae* Houston, a klinických vzorků C4 a C27, u vzorku z *B. quintana* amplifikace neproběhla (viz **Obrázek č. 20**) Při použití primerů specifických pro *B.*

*quintana* došlo k amplifikaci genu *ftsZ* jak u kmene *B. quintana* tak u kmene *B. henselae* Houston, u kmenů C4 a C27 amplifikace neproběhla.



**Obrázek č. 20** Amplifikace genu *ftsZ* u *B. henselae* Houston, *B. quintana*, *B. henselae* C4 a C27

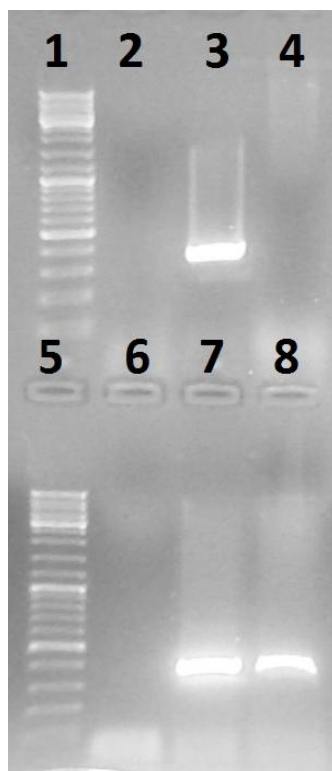
Horní řada: PCR průkaz genu *ftsZ* *B. henselae*, primery BH-F a BH-R, Tm 60,5°C

1. marker, 2. Negativní kontrola, 3. *B. henselae* Houston, 4. *B. quintana*,
5. *B. henselae* C4, 6. *B. henselae* C27

Dolní řada: PCR průkaz genu *ftsZ* *B. quintana*, primery BQ-F a BQ-R, Tm 55,5°C

7. marker, 8. Negativní kontrola, 9. *B. henselae* Houston, 10. *B. quintana*,
11. *B. henselae* C4, 12. *B. henselae* C27

Specifický průkaz genu *ftsZ* byl použit také pro druhové určení klinického vzorku z pacientky se suspektní bartonelovou infekcí, z výsledku PCR (viz **Obrázek č. 21**) vyplývá že původcem je pravděpodobně *B. quintana*.



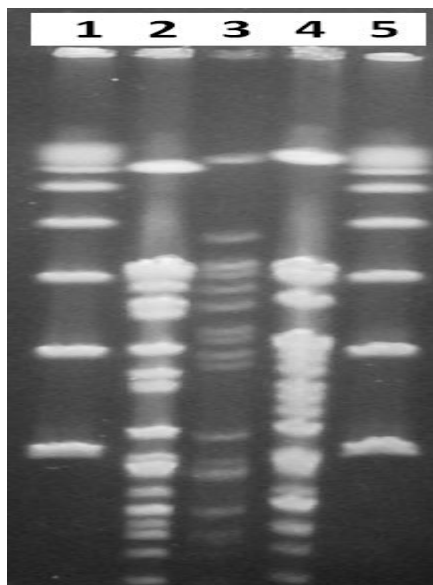
**Obrázek č. 21** Amplifikace genu *ftsZ* u klinického vzorku z kožní biopsie pacientky.

1. Marker, 2. negativní kontrola, 3. Pozitivní kontrola *B. henselae* Houston,
4. Klinický vzorek, 5. Marker, 6. Negativní kontrola, 7. *B. quintana*, 8. Klinický vzorek

### 6.3 Genotypová klonální analýza (typizace)

Referenční kmen *B. henselae* Houston i oba klinické izoláty *B. henselae* C4 a C27 měly rozdílné pulzotypy, což naznačuje, že PFGE je v případě růstu jednou z vhodných typizačních metod i pro tuto růstově náročnou bakterii. Velká adherence bakteriální kultury při přípravě vzorku je nejvíce limitující částí analýzy, která pak výrazně ovlivní kvalitu vzniklých profilů.





**Obrázek č. 22** Makrorestrikční analýza kmenů *B. henselae*

1. PFGE marker, 2. *B. henselae* Houston, 3. *B. henselae* C4, 4. *B. henselae* C27, 5. PFGE marker

## 6.4 Stanovení citlivosti na antibiotika

### 6.4.1 Diskový difúzní test

Jako diskový difúzní test byla použita interní pseudomonádová řada antibiotik s použitím čokoládového agaru. Test byl proveden pouze na typovém kmenu *B. henselae* Houston. Výsledky byly odečteny po 7 dnech kultivace a jsou uvedeny v **Tabulce č. 5**. Slabý růst a veliké inhibiční zóny znemožňovaly řádný odečet citlivostí a proto jsme v testování s klinickými kmeny již dále nepokračovali.

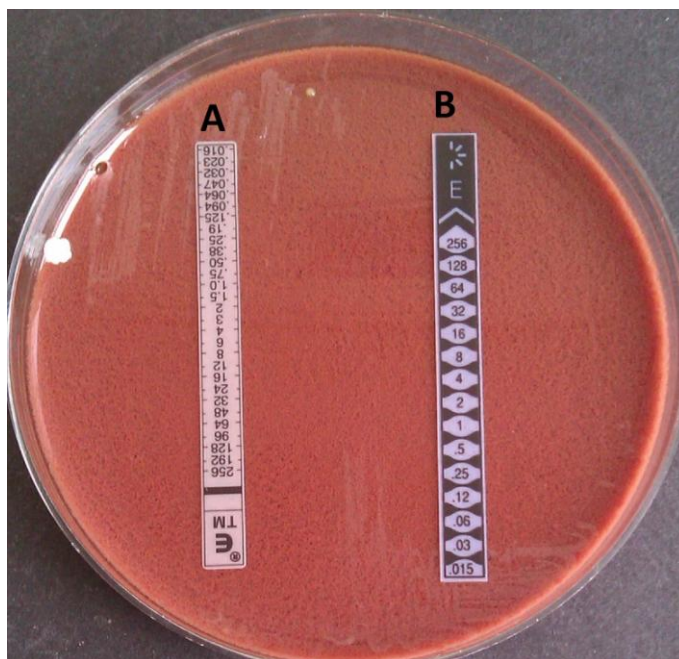
antibiotikum	IZ (mm)	hraniční hodnota	výsledek
ampicilin/sulbactam	30	15	C
kotrimoxazol	20	16	C
colistin	14	10	C
gentamicin	24	15	C
netilmicin	22	15	C
tobramycin	15	15	C
piperacilin/tazobactam	35*	19	C
ceftazidim	30*	22	C
amikacin	29*	17	C
ciprofloxacin	32*	21	C
ofloxacin	20*	16	C
cefepim	22*	18	C
cefoperazon/sulbactam	34*	21	C
imipenem	35*	16	C
meropenem	33*	16	C
tigecyklin	35*	18	C

**Tabulka č. 5** Vyhodnocení citlivostí pseudomonádové řady u *B. henselae* Houston.

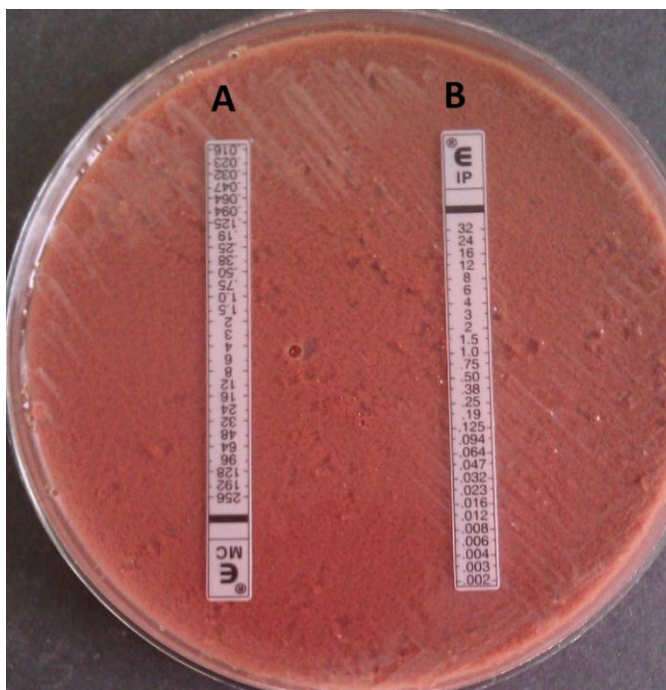
Pozn: \* zóny kolem antibiotických disků byly na měření příliš velké a jejich velikost je pouze orientační

#### 6.4.2 E-test

Odečet E-testů byl proveden po 7 dnech kultivace ve 37°C za přítomnosti CO<sub>2</sub>. Jako kultivační médium byl použit čokoládový agar a antibiotika - erytromycin, tobramycin, imipenem a minocyklin. Tato antibiotika byla zvolena z důvodu, že nebyla testována diskem nebo inhibiční zónu nešlo dobře odečíst a používají se, nebo jejich zástupci v empirické léčbě bartonelových infekcí nebo jsou deklarované jako citlivé *in vitro*. E-testy byla stanovena citlivost referenčních kmenů *B. henselae* Houston a *B. quintana* a klinických izolátů *B. henselae* C4 a C27. MIC pro erytromycin, minocyklin, tobramycin a imipenem u všech analyzovaných kmenů bartonel stanovene pomocí E-testů prokázaly, že tyto kmeny jsou *in vitro* citlivé a byly by vhodnými adepty na léčbu bartonelových infekcí způsobených *B. henselae* a *B. quintana*. Vyhodnocení bylo provedeno na základě uvedených údajů v odborném článku od Wolfsona [71].

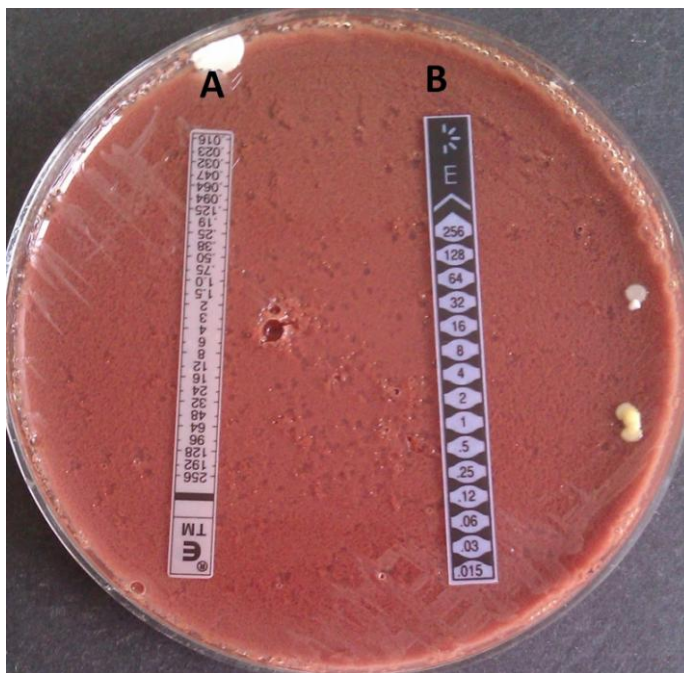


**Obrázek č. 23** *B. henselae* Houston – **A:** tobramycin 0,25µg/ml, **B:** erytromycin 0,03µg/ml

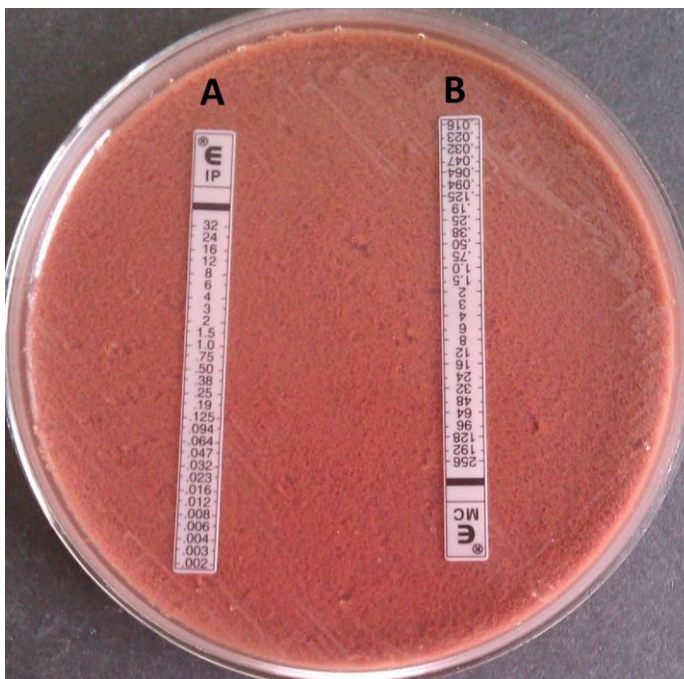


**Obrázek č. 24** *B. henselae* Houston – **A:** minocyklin 0,125µg/ml, **B:** imipenem 0,19µg/ml\*

Pozn: \* uvnitř inhibiční zóny pro imipenem drobný nárůst

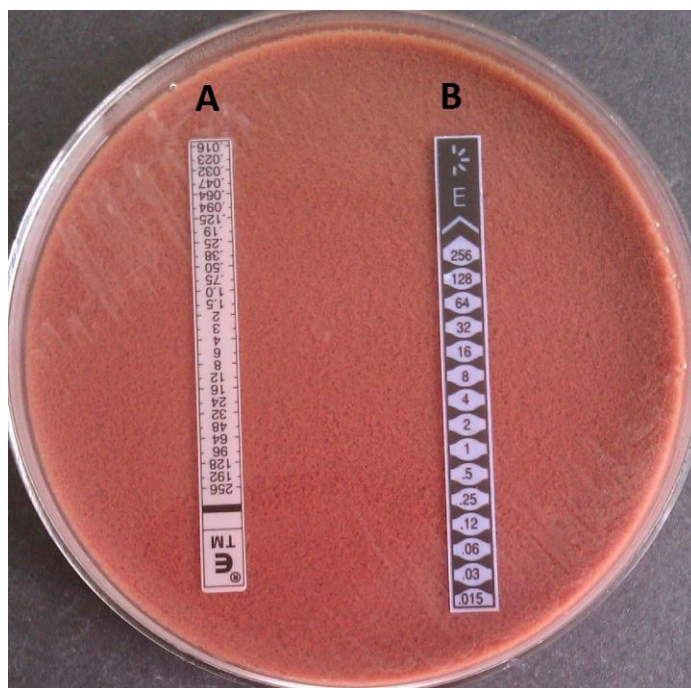


Obrázek č. 25 *B. henselae* C4 – A: tobramycin 0,19µg/ml, B: erytromycin 0,06µg/ml

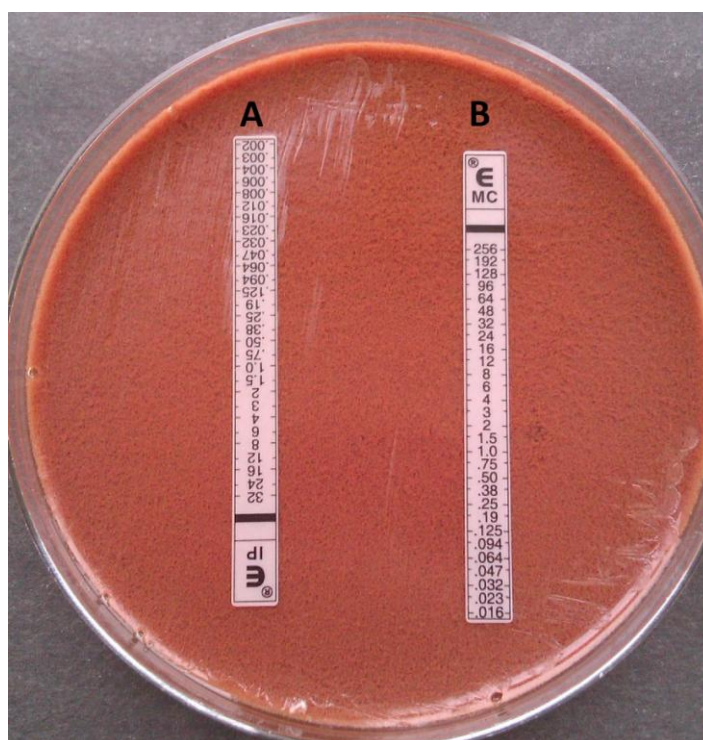


Obrázek č. 26 *B. henselae* C4 – A: imipenem 0,19µg/ml\*, B: minocyklin 0,094µg/ml

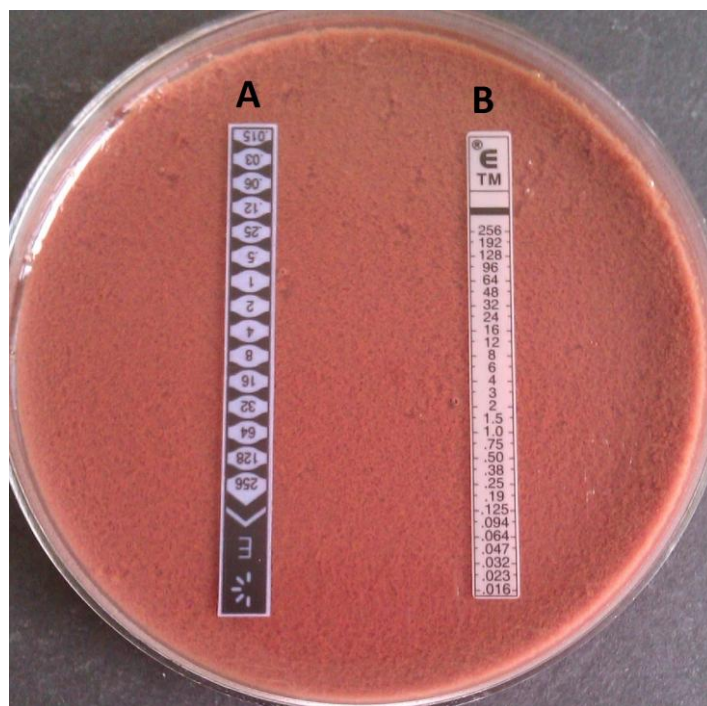
Pozn: \* uvnitř inhibiční zóny pro imipenem drobný nárůst



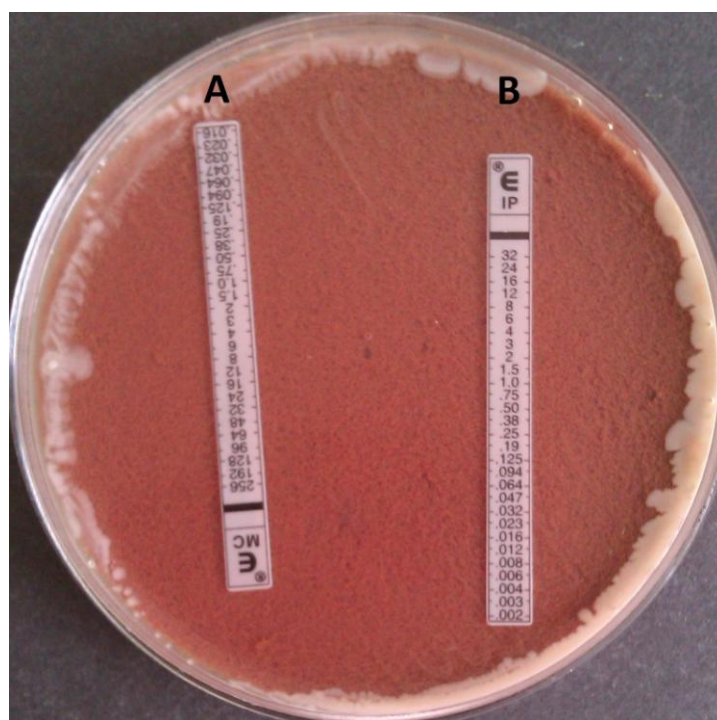
Obrázek č. 27 *B. henselae* C27 – A: tobramycin 0,25 $\mu$ g/ml, B: erythromycin 0,12 $\mu$ g/ml



Obrázek č. 28 *B. henselae* C27 – A: imipenem 0,50 $\mu$ g/ml, B: minocyclin 0,064 $\mu$ g/ml



Obrázek č. 29 *B. quintana* – A: erytromycin 0,15µ/ml, B: tobramycin 1µg/ml



Obrázek č. 30 *B. quintana* – A: minocyclin 0,16µg/ml, B: imipenem 0,75µg/ml

## 7 Diskuze

Předmětem této studie bylo zejména vybrat vhodné genotypové metody na identifikaci nejdůležitějších bartonelových druhů (*B. henselae*, *B. quintana*) a případně pro jejich přímý průkaz v klinickém materiálu.

Kultivace bartonelových referenčních kmenů (*B. henselae* Houston ATCC 49882<sup>T</sup> a *B. quintana* CIP 103739), klinických izolátů C4 a C27 byla prováděna na Columbia krevních a čokoládových agarech, které byly dodány buď přímo od dodavatele nebo byly připravovány na Ústavu lékařské mikrobiologie. Bartonely nejlépe rostly na připravovaných Columbia krevních agarech. Možným důvodem bylo větší množství půdy, která během kultivace nevysychá a čerstvá krev, která je podle některých autorů zásadní pro kultivaci bartonel [68]. Bartonely rostly v menších koloniích na dodávaném Columbia krevním agaru a nerostly vůbec na dodávaném čokoládovém agaru. Kmeny a izoláty dorůstali do 5 dnů a poté se už kolonie nevětšovali. Délka jejich kultivace je mnohem kratší než je to obvyklé pro primokultivace bartonel z klinického materiálu, kdy se uvádí délka kultivace až 30 dnů [69]. V primokultivaci rostou bartonely v silně adherentních koloniích, se kterými je velmi těžké v laboratoři pracovat. V dalších izolacích se však tato vlastnost bartonel ztrácí a kmeny většinou rostou v drsných (R fáze) nebo hladkých koloniích (S fáze) a kolonie jsou nestejně velké, což imituje smíšenou kulturu. V současnosti existuje i tekutá kultivační půda [65] na kultivaci bartonel, její uplatnění v praxi je obtížné z důvodu, že jde o definované médium, které je časově a finančně značně náročné.

Mikroskopie je vhodná v počátečních fázích identifikace, kdy s její pomocí lze buď přímo v klinickém materiálu nebo kultuře potvrdit gramnegativní tyčinky nebo jinou morfologii bakteriálních buněk. V průběhu studia se osvědčila na vyloučení 2 klinických izolátů (C1, C26) z dalších analýz, protože tyto izoláty původně popsané jako *B. henselae* [66] byly mikroskopicky grampozitivní kyjovité tyčinky *Corynebacterium* sp., jejichž růstové vlastnosti byly podobné bartonelám. Bartonelové buňky adherují k sobě a proto se někdy problematicky promývají v průběhu Gramova barvení, což může být znát na zhoršené kvalitě preparátů. Studované kmeny tvořili drobné gramnegativní tyčinky někdy s přítomností kokobacilů a jednotlivé druhy (*B. henselae* a *B. quintana*) ani klinické izoláty (*B. henselae*) nešlo mezi sebou navzájem odlišit.

Bartonely jsou biochemicky inertní a proto jejich biochemickou identifikaci nelze provádět žádnými zkumavkovými testy nebo diagnostickou soupravou. Test na průkaz katalázy a oxidázy byl negativní jak uvádí literatura. Kataláza je u naprosté většiny aerobních bakterií, kromě streptokoků a enterokoků, pozitivní a proto je v tomto případě vhodným testem na jejich odlišení od bartonel. Velkým příslibem se jeví hmotnostní spektrometrie, která je uváděná jako spolehlivá pro identifikaci bartonelových druhů [67]. Na Ústavu lékařské mikrobiologie je používán přístroj MALDI Biotyper 3 (Bruker Taxonomy, Buil 25, verze 4613), který jak jsme se dověděli až retrospektivně neobsahuje databázi s hmotnostními spektry pro jakékoliv bartonelové druhy a identifikace kmenů *B. henselae* i *B. quintana* včetně referenčních byla neúspěšná.

Z genotypové identifikace se jako nejvhodnější ukázala metoda amplifikace genu *gltA* a následná restrikční analýza pomocí restriktázy *TaqI*. Při restrikční analýze se amplikony specificky štěpí na 3 fragmenty o velikosti 71, 137 a 171 bp typické pro *B. henselae* a u *B. quintana* se specificky štěpí na 2 fragmenty o velikosti 63 a 316 bp. Restrikční profil však není vhodný pro identifikaci původců v klinickém materiálu (pacient OL) z důvodu velkého množství proužků (amplikonů) v daném profilu. Ani úpravou annealingové teploty pomocí gradientové PCR se mi nepodařilo odstranit amplifikaci nespecifických amplikonů, které pravděpodobně pocházely z chromozomů hostitelských buněk.

Amplifikace genů *ribC* a *ftsZ* proběhla u obou typových kmenů *B. henselae* a *B. quintana* jak při použití primerů specifických pro *B. henselae* tak primerů specifických pro *B. quintana*. PCR metodou tudíž nešlo odlišit na druhové úrovni tyto dva typové kmény. Příčinou mohla být nedostatečná čistota vzorku DNA (kontaminace) nebo nedokonalá specifická reakce. V případě klinických vzorků byla situace jiná a ve dvou případech (kmen C4 a C27) se amplifikovaly příslušné kmény jen se sadou primerů specifickou pro *B. henselae* a u třetího klinického vzorku pouze se sadou primerů specifickou pro *B. quintana*.

Jako typizační metoda byla provedena pulzní elektroforéza (PFGE), která je vhodná v případě kultivačního průkazu ke klonální analýze izolátů *B. henselae*. V mé studii byla pulzní elektroforéza provedena pouze na třech vzorcích a to na typovém kmenu *B. henselae* Houston ATCC 49882<sup>T</sup> a klinický izolátech *B. henselae* C4 a C27. Silná adherence bartonelových buněk je limitující pro resuspendování bakteriální kultury a proto se musela bakteriální kultura filtrovat přes sterilní gázu.



Ze dvou prováděných metod na průkaz citlivosti na antibiotika, kterými byly diskový difúzní test a E-test, se nejvíce osvědčil právě zmiňovaný E-test, který se odečítal po 7 dnech jak uvádí literatura [59]. Jako kultivační médium byly použity čokoládové agary vylité přímo na Ústavu lékařské mikrobiologie, protože bartonely na čokoládových agarech dodávaných od dodavatele vůbec nerostly. Růst bartonel byl sice na připravených čokoládových agarech ve srovnání s jinými, klinicky významnými bakteriemi, poměrně slabý, ale zóny kolem E-testových proužků byly poměrně dobře viditelné. Diskový difúzní test není příliš vhodný na testování citlivosti bartonel na antibiotika, protože inhibiční zóny kolem antibiotických disků byly příliš velké na to aby se daly zóny změřit

Klinicky významné bartonelózy jako je endokarditida nebo bacilární angiomatóza je potřeba diagnostikovat, vzhledem k tomu, že příznaky těchto nemocí jsou velmi podobné jiným klinicky významným onemocněním.

U endokarditid jde o tzv. kultivačně negativní endokarditidy, které nelze prokázat běžným kultivačním postupem. Je důležité o těchto infekcích informovat hlavně infektology a kardiology, aby v nejasných případech na tuto infekci mysleli a specificky ji diagnostikovali, zejména pomocí serologie nebo amplifikačních technik.

V průběhu experimentální části bakalářské práce nás oslovil kolega z nefrologického oddělení FN Olomouc s žádostí vyšetřit pacientku se suspektní bacilární angiomatózou. Šlo o pacientku po transplantaci kadaverózní ledviny narozenou 1970, u které byla z důvodu transplantace nasazena dlouhodobá imunosupresní léčba a 4 týdenní trvající tvorba červených nodul až verukózních lézí difúzně po těle. Histologický nález byl tvořen tumorózními změnami kapilárního typu a barvení stříbrem (Warthin-Starry), které je vhodné i pro barvení bartonel nebylo dosud provedeno. Požádali jsme kolegy z FN Olomouc o bioptický vzorek z kožní léze a po izolaci DNA bylo možné pomocí amplifikace genů *ribC* a *ftsZ* potvrdit infekci *B.quintana*. Stanovení specifických protilátek IgM a IgG pomocí nepřímé imunofluorescence, která bylo provedeno na jiném pracovišti, bylo paradoxně negativní, což lze vysvětlit snad jen dlouhodobou imunosupresí pacientky.

## ZÁVĚR

V této studii byla provedena optimalizace genotypových metod pro přímý průkaz bartonel v klinickém vzorku od pacientky z Olomouce s podezřením na bacilární angiomatózu a byla prokázána přítomnost *B. quintana*. Tento případ byl vůbec první v celé ČR. Genotypové metody s využitím bartonelových kultur byly také úspěšné a proto bych je doporučovala pro budoucí zavedení diagnostiky bartonelových infekcí. Makrorestrikční analýza DNA pomocí pulzní elektroforézy (PFGE) se osvědčila jako velmi vhodná typizační metoda pro rozlišení bartonelových druhů. Stanovení citlivosti na antibiotika *in vitro* u typových kmenů *B. henselae*, *B. quintana* a klinických izolátů *B. henselae* C4 a C27 bylo provedeno kvalitativní metodou difúzního diskového testu a E-testem. Metoda difúzního diskového testu se ukázala jako nevhodná. Pro zavedení testování citlivostí na antibiotika u bartonel bych doporučovala E-testy. V teoretické části této práce byla zpracována rešerše literatury týkající se tohoto rodu bakterií a problematikou s ní spojenou.

## REFERENČNÍ SEZNAM

1. BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009, s. 301-303. ISBN 978-80-7262-644-1
2. MANDELL, Gerald L., John E. BENNETT a Raphael DOLIN. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th Edition. *Churchill Livingstone*, 2010, s. 2995-3005. ISBN 978-0-443-06839-3
3. MELTER, Oto, *Infekce způsobené B. henselae*, *Praktický lékař*, 1998, č.3, s. 116-117, ISSN: 0032-6739
4. RELMAN, David A., et al. "The agent of bacillary angiomatosis: an approach to the identification of uncultured pathogens." *New England Journal of Medicine*, 323.23 (1990) s. 1573-1580, ISSN 0028-4793 DOI: 10.1056/NEJM199012063232301
5. O'ROURKE, Fiona, et al. "Adhesins of *Bartonella* spp." *Bacterial Adhesion*. *Springer Netherlands*, 2011. s. 51-70, ISSN 0065-2598
6. KELLY PJ, Meads N, Theobald A, Fournier PE, Raoult D. *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, and *B. clarridgeiae*, New Zealand, *Emerging Infectious diseases*, 2004, č. 10, s. 967-968, ISSN: 1080-6059, DOI: 10.3201/eid1005.030986
7. LIM, Chung, Kim, First case of *B. quintana* endokarditis in Korea, *Journal of Korean Medical Science* 2012; 27: 1433-1435, DOI:10.3346/jkms.2012.27.11.1433
8. KOEHLER, J. E., et al. Prevalence of *Bartonella* infection among human immunodeficiency virus-infected patients with fever. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2003, 37.4: 559. ISSN 1058-4838, DOI: 10.1086/375586

9. JACOMO, V.; KELLY, P. J.; RAOULT, D. Natural history of Bartonella infections (an exception to Koch's postulate). *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 2002, 9.1: 8-18. ISSN 1556-6811, DOI:10.1128/CDLI.9.1.8-18.2002
10. BOGUE, Clifford W., et al. Antibiotic therapy for cat-scratch disease?. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 1989, 262.6: 813-816. DOI:10.1001/jama.1989.03430060109034
11. PERKOCHA, Luke A., et al. Clinical and pathological features of bacillary peliosis hepatis in association with human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine*, 1990, 323.23: 1581-1586. ISSN 0028-4793. DOI:10.1056/NEJM199012063232302
12. RAOULT, Didier, et al. Outcome and treatment of Bartonella endocarditis. *Archives of internal medicine*, 2003, 163.2: 226. DOI:10.1001/archinte.163.2.226
13. KOEHLER, Jane E., et al. Molecular epidemiology of Bartonella infections in patients with bacillary angiomatosis–peliosis. *New England Journal of Medicine*, 1997,337.26:1876-1883. ISSN 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJM199712253372603
14. BERNABEU-WITTEL, Luque, Bacillary angiomatosis with atypical clinical presentation in an immunocompetent patients, *Indian Journal of Dermatology, Venerology and Leprology*, 2010,76:682-685. ISSN 0378-6323, DOI: 10.4103/0378-6323.72469
15. SCHMIDT, *Bartonella and Afipia Species Emphasizing*, 1998, *Contributions to Microbiology*, 1:3, ISBN 3-8055-6649-2

16. HARMS, Alexander; DEHIO, Christoph. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clinical microbiology reviews*, 2012, 25.1: 42-78. ISSN 0893-8512, DOI: 10.1128/CMR.05009-11
17. BAORTO, Elizabeth, et al. Culture-negative endocarditis caused by *Bartonella henselae*. *The Journal of pediatrics*, 1998, 132.6: 1051-1054. ISSN 0022-3476
18. KOEHLER, Jane E., et al. Cutaneous vascular lesions and disseminated cat-scratch disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Annals of internal medicine*, 1988, 109.6: 449-455. ISSN 0003-4819
19. EICHER and Christoph Dehio, *Bartonella* entry mechanisms into mammalian host cells, Research Area Infection Biology, Biozentrum of the University of Basel, Klingelbergstrasse 70, CH-4056, Basel, Switzerland. *Cellular Microbiology*, 2012, 1-6. ISSN 1462-5822, DOI: 10.1111/j.1462-5822.2012.0186.x
20. DIAZ, Maureen H., et al. Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes. *Journal of clinical microbiology*, 2012, 50.5: 1645-1649. ISSN 0095-1137, DOI: 10.1128/JCM.06621-11
21. VERMEULEN, M. J., et al. Serological testing for *Bartonella henselae* infections in The Netherlands: clinical evaluation of immunofluorescence assay and ELISA. *Clinical microbiology and infection*, 2007, 13.6: 627-634. ISSN 1469-0691, DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01700.x
22. DRANCOURT, M., et al. New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *The Lancet*, 1996, 347.8999: 441-443. ISSN 0140-6736



virus-positive patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, 30.2: 265-274.  
ISSN 0095-1137

31. JOBLET, Christine, et al. Identification of *Bartonella (Rochalimaea)* species among fastidious gram-negative bacteria on the basis of the partial sequence of the citrate-synthase gene. *Journal of clinical microbiology*, 1995, 33.7: 1879-1883. ISSN 0095-1137
32. ZEAITER, Zaher, et al. Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing groEL sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2002, 52.1: 165-171. ISSN: 1466-5026
33. BERESWILL, Stefan, et al. Molecular Analysis of Riboflavin Synthesis Genes in *Bartonella henselae* and Use of the ribCGene for Differentiation of Bartonella Species by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 1999, 37.10: 3159-3166. ISSN 0095-1137
34. ZEAITER, Zaher; FOURNIER, Pierre-Edouard; RAOULT, Didier. Genomic variation of *Bartonella henselae* strains detected in lymph nodes of patients with cat scratch disease. *Journal of clinical microbiology*, 2002, 40.3: 1023-1030. ISSN 0095-1137, DOI: 10.1128/JCM.40.3.1023-1030.2002
35. FENOLLAR, Florence; RAOULT, Didier. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *Apmis*, 2004, 112.11-12: 785-807. ISSN 1600-0463

36. REGNERY, Russell L.; SPRUILL, Catherine L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of *rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173.5: 1576-1589. ISSN 0021-9193
37. RENESTO, Patricia, et al. Use of rpoB gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *Journal of clinical microbiology*, 2001, 39.2: 430-437. ISSN 0095-1137, DOI:10.1128/JCM.39.2.430-437.2001
38. LA SCOLA, B., Z. Zeaiter, A. Khamis, and D. Raoult. 2003. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. *Trends in Microbiology*.2003, 11:318–321. ISSN 0968-0055
39. BREITSCHWERDT, E. B., R. G. Maggi, A. W. Duncan, W. L. Nicholson, B. C. Hegarty, and C. W. Woods.. *Bartonella* species in blood of immunocompetent persons with animal and arthropod contact. *Emerg. Infect. Dis.* 2007,13:938–941. ISSN 1080-6059
40. REGNERY RL, Olson TG, Perkins BA, BIBB W: Serological response to *Rochalimaea henselae* antigen in suspected cat-scratch disease. *The Lancet* 1992;339:1443-1445. ISSN 0140-6736
41. BARKA, Noori E., et al. EIA for detection of *Rochalimaea henselae*-reactive IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with suspected cat-scratch disease. *Journal of Infectious Diseases*, 1993, 167.6: 1503-1504. ISSN 1537-6613
42. AMEREIN MP, DeBriel D, Jaulhac B, Meyer P, Monteil H, Piemont Y: Diagnostic value of the indirect immunofluorescence assay in cat scratch disease with *Bartonella henselae* and *Afipia felis* antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:200-204



43. KOEHLER JE, Glaser CA, Tapero JW: *Rochalimaea henselae* infection: A new zoonosis with the domestic cat as a reservoir. *JAMA*, 1994;271:531-535. ISSN 0098-7484
44. COOPER, Morris D., et al. A passive hemagglutination test for diagnosis of trench fever due to *Rochalimaea quintana*. *Journal of Infectious Diseases*, 1976, 134.6: 605-609. ISSN 1537-6613
45. MAURIN, M., et al. Isolation and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16S rRNA gene sequencing, and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a patient with bacillary angiomatosis. *Journal of clinical microbiology*, 1994, 32.5: 1166-1171. ISSN 0095-37
46. SANDER A, Ruess M, Steinbrueckner B, Bredt W: DNA-Fingerprinting of *Bartonella henselae* by PFGE, ERIC-PCR, REP-PCR and AP-PCR. 13th Sesqui-Annual Meeting, American Society for Rickettsiology, Seven Springs Mountain Resort, Pa 1997
47. SANDER, Anna, et al. Detection and identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. *Journal of clinical microbiology*, 1997, 35.3: 584-587. ISSN 0095-37
48. SCHMIDT HU, Kaliebe T, Poppinger J, Bühler C, Sander A: Isolation of *Bartonella quintana* from an HIV-positive patient with bacillary angiomatosis. *European Journal of Clinical Microbiology of Infectious Diseases*, 1996;15:736-741. ISSN 0934-9723
49. MATAR, GHASSAN M., et al. Polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis of a fragment of the ribosomal operon

- from *Rochalimaea* species for subtyping. *Journal of clinical microbiology*, 1993, 31.7: 1730-1734. ISSN 0095-1137
50. SCHRÖDER, Gunnar; DEHIO, Christoph. Virulence-associated type IV secretion systems of *Bartonella*. *Trends in microbiology*, 2005, 13.7: 336-342. ISSN 0968-0055
51. Havliš Jan, Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. *Vesmír*, 1999, roč. 78, s. 448 (<http://www.vesmir.cz/clanek/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof>)
52. DARE, Diane. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology: Rapid Bacterial Characterization and Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Springer US*, 2006, s. 117-133. ISBN 978-0-387-29741-5.
53. JOBLET, Christine, et al. Identification of *Bartonella (Rochalimaea)* species among fastidious gram-negative bacteria on the basis of the partial sequence of the citrate-synthase gene. *Journal of clinical microbiology*, 1995, 33.7: 1879-1883. ISSN 0095-1137
54. BERESWILL, Stefan, et al. Molecular Analysis of Riboflavin Synthesis Genes in *Bartonella henselae* and Use of the ribC Gene for Differentiation of *Bartonella* Species by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 1999, 37.10: 3159-3166. ISSN 0095-1137
55. KOČÁREK, Eduard. *Genetika*. Praha: Scientia, 2008. ISBN 978-80-86960-36-4.
56. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, 223 s., [24] s. příl. ISBN 978-802-4731-704.
57. ŠIMŮNEK, Jan, SMOLA, Jiří *Antimikrobiální léčiva ve veterinární medicíně*. Hradec Králové: Prion, 251 s. ISBN 80-903188-8-6

58. MAURIN, Max, et al. MICs of 28 antibiotic compounds for 14 *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1995, 39.11: 2387-2391. ISSN 0066-4804
59. PENDLE, S.; GINN, A.; IREDELL, J. Antimicrobial susceptibility of *Bartonella henselae* using Etest methodology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 57.4: 761-763. ISSN 0066-4804
60. RYŠKOVÁ Olga, Návody k praktickým cvičením z lékařské mikrobiologie, 1. Vydání, Praha: Karolinum, 1997, ISBN 80-7184-307-5
61. BRENNER DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG, Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*., *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1993 Oct;43(4):777-86. ISSN 0020-7713
62. HUARCAYA, Erick et al. A prospective study of cat-scratch disease in Lima-Peru. *Revista do Instituto de Medicina tropical Sao Paulo*, 2002, vol.44, n.6, pp. 325-330. ISSN 0036-4665
63. MILLER-CATCHPOLE R, Variakojis D, Vardiman JW, et al. Cat scratch disease: identification of bacteria in seven cases of lymphadenitis. *American Journal of Surgical Pathology*.1986;10:276-281. ISSN 0147-5185
64. VERSALOVIC, J., Manual of Clinical Microbiology, 10 ed., ASM press, 2011, ISBN 978-1-55581-463-2
65. MAGGI, Ricardo E. et al. Novel Chemically Modified Liquid Medium That Will Support the Growth of Seven *Bartonella* Species. *Journal of Clinical*

*Microbiology*, 2005, roč. 43, č. 6, 2651–2655. DOI: 10.1128/JCM.43.6.2651–2655.2005. ISSN 0095-1137, DOI:10.1128/JCM.43.6.2651–2655.2005

66. MELTER et al. , Detection and characterization of feline *B. henselae* in the Czech Republic, *Veterinary Microbiology*, 2003, 93:261. ISSN 0378-1135
67. SENG, Piseth, et al. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future microbiology*, 2010, 5.11: 1733-1754. ISSN 1746-0913
68. MYERS, William F.; CUTLER, Leonard D.; WISSEMAN, Charles L. Role of erythrocytes and serum in the nutrition of *Rickettsia quintana*. *Journal of bacteriology*, 1969, 97.2: 663-666. ISSN 0021-9193
69. WONG, Michael T., et al. A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea (Bartonella) henselae* from blood and tissue specimens. *Journal of clinical microbiology*, 1995, 33.3: 742-744. ISSN 0095-1137
70. SCHILLER, J. et al. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782704000268>
71. WOLFSON et al., Etest for antimicrobial susceptibility testing of *B. henselae*. *JAC*, 1996, 38: 963-968. ISSN 0305-7453