

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Barbora Učíková

Molekulární identifikace, typizace a adaptace *Achromobacter* spp. v průběhu chronické infekce
Molecular identification, typing and adaptation of *Achromobacter* spp. during the course of chronic
infection

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel: prof. MUDr. Pavel Dřevínek, Ph.D.

Konzultanti: doc. MVDr. Oto Melter, Ph.D.

RNDr. Irena Lichá, CSc.

doc. RNDr. Eva Kmoníčková, CSc.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 10. 8. 2022

Podpis

Poděkování

Děkuji panu prof. MUDr. Pavlovi Dřevínkovi, Ph.D., za odborné vedení práce, panu doc. MVDr. Oto Melterovi, Ph.D., za poskytování konzultací. Dále děkuji paní RNDr. Ireně Liché, CSc., a paní doc. RNDr. Evě Kmoníčkové, CSc., za poskytování odborných rad. Děkuji pracovníkům Ústavu lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol za poskytování odborných rad v oblastech jednotlivých metod. Děkuji panu Mgr. Janu Suchanovi a dalším pracovníkům z Národní referenční laboratoře pro průkaz infekčních agens elektronovou mikroskopií SZÚ za zaučení a pomoc při zpracování vzorků pro elektronovou mikroskopii.

Abstrakt

Achromobacter spp. je nově se objevující patogen zejména chronických respiračních infekcí u pacientů s cystickou fibrózou. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF poskytuje spolehlivou identifikaci pouze na úrovni rodu. Pro druhovou identifikaci zástupců se používá sekvence genu *nrdA*. Studium klonality s využitím multilokusové sekvenční typizace lze zjistit, zda je pacient infikován stále stejným klonem, nebo zda postupem času dochází k reinfekci novým kmenem. Do naší studie byly zařazeny časosběrné izoláty *Achromobacter* spp. od pacientů s cystickou fibrózou. Pacienti byly rozděleni do tří skupin, podle časového intervalu mezi odběry. U první skupiny činil vnější interval mezi odběry cca 10 let, u druhé 7 až 12 měsíců a zbývající skupinu tvořily samostatné izoláty. V průběhu chronické infekce dochází k adaptaci *Achromobacter* spp. na exponující antibiotika i na hostitele. Izoláty odebrané v intervalu deseti let vykazovaly vyšší počet mutací než izoláty s intervalem odběrů do jednoho roku. V průběhu chronické infekce dochází ke ztrátě motility, což jsme prokázali fenotypově na úrovni motility, snížení počtu bičíků i změny v genech pro tvorbu bičíků. U některých izolátů bylo zaznamenáno zvýšení rezistence screeningovou diskovou difúzní metodou. Vzhledem ke stále častější izolaci *Achromobacter* spp. z klinického materiálu a vzhledem k jeho přirozené multirezistenci roste potřeba poznání této bakterie a s tím související hledání efektivních možností léčby.

Klíčová slova: multirezistence; cystická fibróza; chronická infekce; *Achromobacter*; motilita; NGS

Abstract

Achromobacter spp. is an emerging pathogen, especially in chronic respiratory infections in patients with cystic fibrosis. MALDI-TOF mass spectrometry provides reliable identification only at the genus level. The *nrdA* gene sequence is used for species identification of representatives. Clonality studies using multilocus sequence typing can determine whether a patient is still infected with the same clone or whether reinfection with a new strain occurs over time. Time-collected isolates of *Achromobacter* spp. from patients with cystic fibrosis were included in our study. Patients were divided into three groups according to the time interval between collections. In the first group, the external interval between collections was approximately 10 years, in the second group 7 to 12 months, and the remaining group consisted of single isolates. In the course of chronic infection, *Achromobacter* spp. adapt to the exposed antibiotics and to the host. Isolates sampled at an interval of 10 years showed a higher number of mutations than isolates with a sampling interval of up to one year. During chronic infection, loss of motility occurs, which we demonstrated phenotypically at the level of motility, reduction in flagella number and changes in flagellar genes. Increased resistance was observed in some isolates by disc diffusion screening method. With the increasing isolation of *Achromobacter* spp. from clinical material and due to its inherent multidrug resistance, there is a growing need of understanding this bacterium and the associated search for effective treatment options.

Keywords: multidrug resistance; cystic fibrosis; chronic infection; *Achromobacter*; motility; NGS

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍLE	11
3	PŘEHLED LITERATURY	12
3.1	Cystická fibróza	12
3.2	Charakteristika rodu <i>Achromobacter</i>	15
3.3	Identifikace a typizace <i>Achromobacter</i> spp.	16
3.3.1	Identifikace rodu <i>Achromobacter</i>	16
3.3.2	Druhová identifikace a molekulární typizace <i>Achromobacter</i> spp.	17
3.4	Faktory virulence a mechanismy adaptace	20
3.5	Citlivost a rezistence <i>Achromobacter</i> spp. vůči antibiotikům	23
3.5.1	Mechanismy rezistence <i>Achromobacter</i> spp. vůči antibiotikům	24
3.6	Léčba infekcí způsobených <i>Achromobacter</i> spp.	27
4	MATERIÁL A METODY	29
4.1	Materiál	29
4.1.1	Sputa a izoláty <i>Achromobacter</i> spp.	29
4.1.2	Kultivační média	30
4.1.3	Chemikálie a diagnostické a izolační soupravy	31
4.2	Metody	34
4.2.1	Zpracování klinického materiálu a identifikace izolátu na úrovni rodu	34
4.2.2	Molekulární identifikace a typizace	34
4.2.3	Screening citlivosti vůči antibiotikům v průběhu chronické infekce	39
4.2.4	Stanovení swimming motility	40
4.2.5	Transmisní elektronová mikroskopie	41
4.2.6	Bioinformatická analýza genetických změn pozdních izolátů	43
5	VÝSLEDKY	44
5.1	Identifikace a typizace <i>Achromobacter</i> spp.	44
5.1.1	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	44
5.1.2	Sekvenace genu <i>nrdA</i>	45
5.1.3	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	45
5.1.4	Multilokusová sekvenční typizace (MLST)	46
5.2	Screening citlivosti vůči antibiotikům v průběhu chronické infekce	48
5.3	Stanovení swimming motility	55
5.4	Transmisní elektronová mikroskopie	57
5.5	Bioinformatická analýza genetických změn pozdních izolátů	60

6	DISKUZE	64
6.1	Identifikace <i>Achromobacter</i> spp.	64
6.2	Typizace <i>Achromobacter</i> spp.	65
6.3	Bioinformatická analýza genetických změn pozdních izolátů	67
6.4	Screening citlivosti vůči antibiotikům v průběhu chronické infekce	70
6.5	Změny motility	73
7	SOUHRN	75
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76
	PŘÍLOHA 1	0

Seznam zkratek

ABC transportér	<i>ATP-binding cassette transporter</i> , ATP-vázající kazetový transportér
AmpC	Skupina chromozomálních inducibilních β -laktamáz
AXC	<i>Achromobacter xylosoxidans carbapenemase</i> , karbapenemáza objevená u <i>Achromobacter xylosoxidans</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> bujon
BSAC	<i>British Society for Antimicrobial Chemotherapy</i> , britská společnost pro antimikrobiální chemoterapii
CCM	<i>Czech Collection of Microorganisms</i> , Česká sbírka mikroorganismů
Centrum CF při FN Motol	Centrum cystické fibrózy při Pediatrické klinice Fakultní nemocnice v Motole a 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
CF	<i>Cystic fibrosis</i> , Cystická fibróza
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> , transmembránový regulátor vodivosti
DDST	<i>Double Disk Synergy Test</i> , test synergie dvou disků
DES	<i>Danish Epidemic Strain</i> , dánský epidemický kmen
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , kyselina ethylendiamintetraoctová
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamases</i> , beta-laktamázy širokého spektra
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> , Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
FENO	<i>Fractional Exhaled Nitric Oxide</i> , frakce vydechaného oxidu dusného
FEV1	<i>Forced Expiratory Volume in 1 second</i> , usilovný výdechový objem v první sekundě po maximálním nádechu
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> , infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GSP	<i>General Secretory Pathway</i> , obecná sekretorická dráha
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i> , Lineární diskriminační analýza
LPS	Lipopolysacharid vnější membrány

MALDI-TOF (MS).....	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization time-of-flight Mass Spectrometry</i> , hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací za účasti matrice s detektorem doby letu
MBL.....	<i>Metallo-beta-lactamases</i> , metalo-beta-laktamázy
MFS transportér	Efluxní systém typu <i>Major facilitator superfamily</i>
MGE	<i>Mobile genetic elements</i> , mobilní genetické elementy
MH agar	<i>Mueller-Hinton agar</i>
MIC.....	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i> , minimální inhibiční koncentrace
MLSA	<i>Multilocus Sequence Analysis</i> , multilokusová sekvenční analýza
MLST.....	<i>Multilocus Sequence Typing</i> , multilokusové sekvenční typizace
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i> , sekvenování nové generace
NRL	Národní referenční laboratoř
PCA.....	<i>Principal Component Analysis</i> , analýza hlavních komponent
PCR.....	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , polymerázová řetězová reakce
RND.....	Efluxní systém typu <i>resistance-nodulation-division</i>
ST.....	<i>Sequence Type</i> , sekvenční typ
SZÚ.....	Státní zdravotní ústav
T2SS	<i>Type II Secretion System</i> , sekreční systém typu II
T3SS	<i>Type III Secretion System</i> , sekreční systém typu III
TEM.....	<i>Transmission Electron Microscopy</i> , transmisní elektronová mikroskopie
TMB.....	<i>Tripoli Metallo-beta-lactamase</i> , Tripoli metalo-beta-laktamáza
TSA.....	<i>Tryptone Soya Agar</i>

1 ÚVOD

Achromobacter spp. je nově se objevující patogen zejména chronických respiračních infekcí u pacientů s cystickou fibrózou. Vzhledem ke stále častější izolaci *Achromobacter* spp. z klinického materiálu roste potřeba poznání této bakterie společně a s hledáním efektivních možností léčby, která bývá komplikovaná z důvodu přirozené rezistence achromobakterů vůči mnoha skupinám antibiotik.

Achromobacter je rod aerobních, nefermentujících, nesporulujících gramnegativních tyčinek. Je příbuzný s rody *Bordetella* a *Alcaligenes* a v minulosti byl několikrát taxonomicky překlasifikován, ale v současnosti tvoří samostatný rod. K identifikaci rodu je dostačující hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, pro druhovou identifikaci se nejčastěji využívá sekvenace genu *nrdA*. Pro účely genotypizace bylo v roce 2012 navrženo schéma multilokusové sekvenční typizace (MLST), pomocí kterého lze izoláty rozdělit na různé sekvenční (ST) typy.

V experimentální části této práce jsme zpracovávali sputum pacientů s CF, ze kterého jsme izolovali a identifikovali *Achromobacter* spp. pro další analýzy. Následovala druhová identifikace pomocí sekvenace genu *nrdA*. Pro studium epidemiologie a klonality jsme analyzovali izoláty metodami FTIR-spektroskopie a MLST s využitím celogenomové sekvenace. Časoběrné izoláty jsme testovali screeningovou metodou diskového difuzního testu pro posouzení antibiotické citlivosti. Naše data jsme doplnili o výsledky dalších odběrů sledovaných pacientů zaznamenané v laboratorním informačním systému (MicLab), které byli získány stejnou metodou. Pro posouzení změn motility bakterií jakožto adaptačního mechanismu jsme izoláty analyzovali fenotypovým testem pro swimming motilitu, transmisní elektronovou mikroskopií a porovnáním genetických změn ovlivňujících motilitu mezi časoběrnými izoláty. Bioinformatickými metodami jsme analyzovali geny, které se podílejí na adaptaci patogenu v průběhu chronické infekce. Schéma průběhu experimentální části práce je vyobrazeno na obrázku 1.



Obrázek 1. Schéma průběhu experimentální části práce.

2 CÍLE

Cíle diplomové práce byly následující:

- Identifikovat druhy *Achromobacter* spp. a odhadnout jejich prevalenci u pacientů s cystickou fibrózou navštěvující Centrum cystické fibrózy při Pediatrické klinice Fakultní nemocnice v Motole a 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
- Typizovat izoláty *Achromobacter* spp. od vybraných pacientů metodami multilokusové sekvenční typizace (MLST) a FTIR-spektroskopie
- Posoudit změny antibiotické citlivosti izolátů od pacientů s cystickou fibrózou v průběhu trvání chronické infekce *Achromobacter* spp.
- Zjistit, zda dochází ke změnám motility a počtu bičíků na buňku u longitudinálních izolátů v průběhu chronické infekce *Achromobacter* spp.
- Vyhodnotit genotypové adaptační změny izolátů v průběhu chronické infekce *Achromobacter* spp.

3 PŘEHLED LITERATURY

3.1 Cystická fibróza

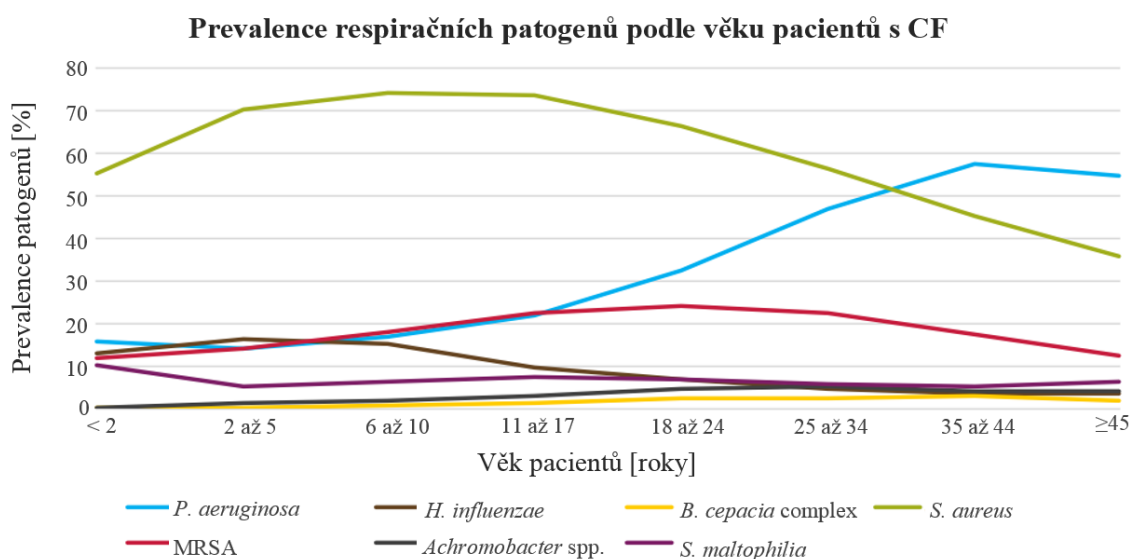
Cystická fibróza (dále jen CF) je dědičným onemocněním. Byla pojmenována podle tvorby cyst a vazivovatění tkáně pankreatu (Pettit & Fellner 2014). Je způsobena mutací genu *CFTR* pro stejnojmenný protein CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, transmembránový regulátor vodivosti). Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění, které se projeví pouze v případě, že proband zdědí defektní alelu od obou rodičů (Vankeerberghen *et al.* 2002, Pettit & Fellner 2014). Gen *CFTR* je lokalizován na dlouhém raménku 7. chromozomu, v oblasti 7q31.2. Jeho velikost činí přibližně 190 kbp a expresí vzniká protein o délce 1480 aminokyselin. Protein CFTR je chloridovým kanálem, jeho hlavní funkcí je hydratace tělesných sekretů a udržování jejich nízké viskozity (Hakkak *et al.* 2013). V případě nefunkčnosti proteinu CFTR jsou sekrety dýchacích cest a exokrinních žláz viskóznější (Vankeerberghen *et al.* 2002).

Je známých více než 2 000 mutací CFTR, ale ne všechny způsobují cystickou fibrózu (Cystic Fibrosis Foundation 2021, <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>). Je možné je rozdělit do šesti tříd podle vlivu na výsledný CFTR protein. Mutace I. třídy (např. G542X) mají za následek vznik předčasných terminačních kodonů a následnou tvorbu defektních nebo žádných CFTR proteinů. U mutací II. třídy (např. F508del) vznikají chybně složené proteiny, které jsou předčasně degradovány. Třída III. (např. G551D) zahrnuje poruchy regulace, kdy nedochází k aktivaci CFTR proteinu za pomoci ATP či cAMP a k dostatečnému otevírání kanálu. Mutace IV. třídy (např. R334W) způsobují zhoršenou funkci a snížený transport chloridových iontů. V rámci mutací V. třídy (např. R117H) dochází k syntéze plně funkčního proteinu CFTR, který ale v důsledku změn na promotoru není exprimován v dostatečném množství. U poslední, VI. třídy, jsou na C-konci proteinu přítomny mutace urychlující jeho degradaci (Pettit & Fellner 2014).

Nejběžnější mutací je F508del vyskytující se v 85,8 % případů CF v alespoň jedné alelické kopii (Cystic Fibrosis Foundation 2021). U F508del dochází k deleci tří párů bazí kódující aminokyselinu fenylalanin na pozici 508 (Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health 2018). Nejběžnějšími komplikacemi CF je zvýšená náchylnost k respiračním infekcím, insuficience pankreatu, mužská neplodnost, hyperglobulinemie a hypoglobulinemie především ve třídě IgG. Výrazným příznakem je zvýšená koncentrace chloridů v potu (www.novorozeneckyscreening.cz).

V České republice se současně době vyšetřuje přítomnost CF při novorozeneckém screeningu. Detekce probíhá v suché kapce krve za pomoci imunoreaktivního trypsinu. V případě pozitivního záchytu se výsledek ověřuje potním testem analyzujícím koncentraci chloridů v potu novorozence. Incidence CF v ČR se uvádí přibližně 1:4500 živě narozených dětí (www.novorozeneckyscreening.cz). V ČR žije v současnosti cca 700 pacientů s klasickou formou cystické fibrózy (<https://klubcf.cz/>). Symptomy se většinou začínají objevovat kolem 6. měsíce věku dítěte (www.novorozeneckyscreening.cz).

Mezi nejzávažnější projevy CF spadají respirační obtíže, které jsou zodpovědné za 80 % úmrtí souvisejících s tímto onemocněním (Pettit & Fellner 2014). Pacienti s CF se potýkají s chronickou obstrukcí plic, kterou není možné zmírnit antihistaminiky. Mívají recidivující sinusitidy, bronchitidy a bronchopneumonie provázené buď vlhkým nebo suchým dráždivým kašlem (www.novorozeneckyscreening.cz). Ve viskózním sekretu se v plicích mohou snadno množit bakterie a způsobit infekci a neutrofilní zánět. Účinkem proteáz a kyslíkových radikálů dochází k poškození epitelu dýchacích cest vedoucí postupně k respirační insuficienci (Fila 2014), může nastat až respirační selhání (www.cff.org). Většina pacientů s CF trpí nějakou chronickou bakteriální infekcí (Gabrielaite *et al.* 2021a), přičemž infekce plic pacientů začínají již v raném dětství, jak je vyobrazeno na obrázku 2 (Cystic Fibrosis Foundation 2021). Prvním významným infikujícím patogenem bývá *Staphylococcus aureus*, teprve později v dětství či dospívání se přidávají infekce způsobené *Pseudomonas aeruginosa* (dále jen *P. aeruginosa*). V posledních desetiletích se začínají objevovat nové patogeny, jako jsou *Achromobacter* spp. (Filipic *et al.* 2017) nebo *Burkholderia cepacia* komplex (Horsley & Jones 2012).



Obrázek 2. Prevalence respiračních patogenů u pacientů s CF v závislosti na jejich věku. Upraveno podle (Cystic Fibrosis Foundation 2021).

Kolonizace dýchacích cest většinou nastává při poklesu plicních funkcí definovaných pomocí FEV1 (*forced expiratory volume*) (Swenson & Sadikot 2015). FEV1 je definován jako usilovný výdechový objem v první sekundě po maximálním nádechu (Kociánová 2017). Podle některých studií může naopak chronická infekce způsobená *A. xylosoxidans* vést k poklesu plicních funkcí (Coward *et al.* 2016, Veschetti *et al.* 2021). Může existovat spojitost mezi špatnou funkcí plic a schopností *A. xylosoxidans* tvořit biofilm v dýchacích cestách pacientů s cystickou fibrózou (Coward *et al.* 2016). U více než poloviny pacientů s cystickou fibrózou s kolonizací respiračního traktu *A. xylosoxidans* dochází k rozvoji chronické infekce dýchacích cest (Veschetti *et al.* 2021). Někteří autoři považují za kritérium chronické kolonizace alespoň 3 pozitivní odběry za rok s minimálním intervalem 1 měsíc po dobu nejméně 2 let (Pereira *et al.* 2011, Filipic *et al.* 2017). Gabrielaite *et al.* (2021b) popisují chronickou infekci jako alespoň polovinu odběrů pozitivních na *Achromobacter* spp. od daného pacienta, který je sledován alespoň 1 rok s frekvencí odběrů minimálně čtyř vzorků za rok.

Prevalence infekcí způsobených *Achromobacter* spp. u pacientů s CF v ČR činí přibližně 4,3 % (Centrum cystické fibrózy při Pediatrické klinice Fakultní nemocnice v Motole a 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, dále jen Centrum CF při FN Motol, osobní sdělení). V jiných studiích byla u pacientů s CF zjištěna prevalence *A. xylosoxidans* 21,8 % v Brazílii, 16 % v Itálii, 17,5 % ve Francii (Filipic *et al.* 2017) a 10 % v Dánsku (Ridderberg *et al.* 2011) a *Achromobacter* spp. 2 – 17,9 % v Argentině (Papalia *et al.* 2020a). Prevalence infekcí *Achromobacter* spp. u pacientů s CF se neustále zvyšuje (Ridderberg *et al.* 2011, Filipic *et al.* 2017, Papalia *et al.* 2020a). Zvýšený výskyt může také souviset se zdokonalováním diagnostických technik (Ridderberg *et al.* 2012, Pickrum *et al.* 2020).

Léčba CF zahrnuje užívání inhalačních mukolytik a pravidelné provádění dechové fyzioterapie několikrát denně. Je důležité dbát na dostatečnou výživu pomocí vysokokalorické stravy, substituce pankreatických enzymů a zvýšeného příjmu soli a vitaminů rozpustných v tucích (<https://klubcf.cz/>, www.novorozeneckyscreening.cz). Aby se předešlo infekcím, je důležité striktně dodržovat hygienu a zamezit nákaze kapénkami či kontaminací v oblasti nosu, úst a očí. Pacienti s cystickou fibrózou by se vzájemně neměli setkávat (<https://klubcf.cz/>).

Až donedávna byla léčba CF pouze symptomatická. Od roku 2012 se začínají používat léky modifikující protein CFTR. Při užívání modulátorů CFTR proteinu dochází mimo jiné i ke zlepšení plicních funkcí a ke snížení rizika výskytu plicních exacerbací (akutní zhoršení zdravotního stavu doprovázené zvýšenou dušností a kašlem) (Fila 2021). Hlavní z těchto látek

je ivakaftor, který prodlužuje čas, po který je kanál CFTR otevřen a chloridové ionty se mohou skrz něj transportovat. U některých mutací CFTR proteinu je potřeba ivakaftor užívat v kombinaci s dalšími modulátory CFTR proteinu, tzv. korektory, které napomáhají proteinu CFTR v transportu na membránu epitelových buněk, kde ivakaftor kanál otevře, aby mohlo docházet k transportu chloridových iontů (Pettit & Fellner 2014). Mezi používané korektory řadíme lumakaftor, tezakaftor a elexakaftor, mezi které v brzké době přibude další zástupce bamokaftor, známý pod označením VX-659. Léčba současnými modulátory CFTR proteinu by v ČR mohla pomoci více než 90 % pacientů s CF (Fila 2021).

3.2 Charakteristika rodu *Achromobacter*

Rod *Achromobacter* byl poprvé popsán v roce 1923 v publikaci *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Náleží řádu Burkholderiales (Isler *et al.* 2020) ze skupiny Betaproteobacteria (Li *et al.* 2013). Název pochází ze slov *achromus* (z řeč. bezbarvý) a *bactrum* (z řeč. tyč), tj. bezbarvá tyčinka (Yabuuchi & Yano 1981), která neprodukuje pigment (Isler *et al.* 2020). Později byl rod *Achromobacter* přiřazen k rodu *Alcaligenes*, ale v roce 1981 byl zpět překlasiifikován na samostatný rod. Fylogenomickou analýzou založenou na studii konzervovaných proteinů bylo zjištěno, že více než s *Alcaligenes* je příbuzný s rodem *Bordetella*, především s druhem *Bordetella pertussis* (Li *et al.* 2013), který je rovněž nově popsaným oportunním patogenem pacientů s CF (Carleton *et al.* 2014). Velikost genomu achromobakterů činí 6–7 Mbp (Li *et al.* 2013) a obsahuje velké zastoupení GC párů v sekvenci DNA (Yabuuchi *et al.* 1974, Yabuuchi & Yano 1981, Li *et al.* 2013), které se pohybuje v rozmezí 65–68 %. Vyšší obsah GC párů může souviset s odolností bakterie v nepříznivých podmínkách, neboť genom bývá více stabilní (Li *et al.* 2013).

Achromobacter spp. jsou ubikviterní, aerobní, nefermentující, nesporulující gramnegativní rovné tyčinky (Yabuuchi & Yano 1981, Swenson & Sadikot 2015). Rod zahrnuje mnoho druhů s podobným fenotypem, avšak geneticky odlišných (Swenson & Sadikot 2015, Okoliegbe *et al.* 2020). Většina z nich jsou nepatogenní, přirozeně se vyskytují v půdě a ve vodném prostředí (Almuzara *et al.* 2010, Li *et al.* 2013, Swenson & Sadikot 2015). Mezi potenciálně patogenní druhy patří především *Achromobacter xylosoxidans* (Swenson & Sadikot 2015), který byl prvně izolován a popsán Yabuuchi a Ohyama v roce 1971 v Japonsku z hnisavých výtoků z uší pacientů s chronickým purulentním zánětem středního ucha (Yabuuchi & Ohyama 1971). *Achromobacter* spp. se v posledních desetiletích objevují jako oportunní patogeny u predisponovaných pacientů. Nejčastěji bývají izolovány z dolních dýchacích cest

pacientů s CF, kdy zejména kvůli vysoké viskozitě sekretu dolních cest dýchacích (Filipic *et al.* 2017) a omezení mukociliární funkce (Mantovani *et al.* 2012) dochází k omezené expektoraci mikrobiální složky (Filipic *et al.* 2017). Také se vyskytují jako původci infekcí spojených se zdravotní péčí na jednotkách intenzivní péče, byly izolovány např. z krve, likvoru, hnisu, moči, stolice, výtěrů očí, uší a hrtanu. Byly prokázány i v nesterilizované destilované vodě a v dezinfekčních roztocích na bázi chlorhexidinu, ke kterému jsou rezistentní. Jsou přirozeně rezistentní na některá beta-laktamová a aminoglykosidová antibiotika (Yabuuchi & Yano 1981). V pohybu jim pomáhají peritrichní bičíky, jejichž počet může být od jednoho do dvaceti na buňku. Velikost bakteriální buňky se pohybuje v rozmezí 0,8 – 1,2 x 2,5 – 3,0 μm (Busse & Auling 2015).

Achromobakteri způsobují především plicní infekce s následnou exacerbací u pacientů s CF, která je nejčastěji uváděným základním onemocněním spojeným s touto infekcí. U pacientů s jiným rizikovým faktorem než je CF mohou mít za následek respirační infekce jako komunitní pneumonie a bronchopneumonie (Swenson & Sadikot 2015). Rovněž způsobuje u hospitalizovaných pacientů bakteriémie a sepsy, vzácně infekce kůže a měkkých tkání, očí, uší, močových cest, peritonitidy a meningitidy. Ve výjimečných případech byl izolován od pacientů s endokarditidou a osteomyelitidou. Mezi rizikové faktory patří kromě CF zavedené katétry, diabetes mellitus, chronické selhávání ledvin, chronická onemocnění srdce, hospitalizace (Isler *et al.* 2020), hematologická onemocnění či karcinomy solidních orgánů (Swenson & Sadikot 2015). Nejrozšířenějším zástupcem rodu *Achromobacter* je u pacientů s CF *A. xylosoxidans*, mezi další nejběžnější druhy patří *A. ruhlandii*, *A. dolens*, *A. insuavis* a *A. spiritinus* (Filipic *et al.* 2017). Přirozená multirezistence a schopnost získat rezistenci na další antibiotika je zásadním faktorem pro vznik chronické infekce (Ridderberg *et al.* 2012).

3.3 Identifikace a typizace *Achromobacter* spp.

3.3.1 Identifikace rodu *Achromobacter*

Pro identifikaci *Achromobacter* spp. lze v klinických laboratořích využít hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization time-of-flight*, matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s detektorem doby letu) (Garrigos *et al.* 2021a). MALDI-TOF je rychlá a přesná metoda identifikace bakterií, které se díky příznivé ceně vyšetření používá pro diagnostiku patogenů. Využívá zejména proteinové profily získané pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie přímo z bakteriálních kolonií, jelikož různé

druhy bakterií, plísní i kvasinek vykazují specifická hmotnostní spektra. Některé píky značící molekulové hmotnosti iontů na spektrálním profilu jsou specifické pro určitý bakteriální rod, druh, či případně poddruh (Carbonnelle *et al.* 2011). V některých případech umožňuje MALDI-TOF i částečné vyhodnocení antibiotické rezistence (Kostrzewa *et al.* 2013). Vyhodnocení probíhá na základě porovnání získaných proteinových profilů s databází a následném určení pravděpodobného druhu analyzované bakterie (Carbonnelle *et al.* 2011).

Pro *Achromobacter* spp. však metoda MALDI-TOF poskytuje spolehlivou identifikaci pouze na úrovni rodu. S výchozí databází MALDI Biotyper (MBT-IVD-DB-7712 MSP) byla identifikace druhů *Achromobacter* touto metodou spolehlivá pouze na 51 %. Chybná či neúplná identifikace byla dána především omezeným množstvím druhů zahrnutých v původní databázi, která obsahovala jmenovitě druhy *A. xylosoxidans*, *A. denitrificans*, *A. ruhlandii*, *A. piechaudii*, *A. insolitus* a *A. spanius*. Druhy, které nebyly v databázi, byly systémem MALDI Biotyper chybně vyhodnocovány jako druh *A. xylosoxidans*. Při rozšíření databáze ve studii na 18 druhů pomocí 38 izolátů *Achromobacter* spp. identifikovaných do druhů pomocí sekvenace genu *nrda* bylo dosaženo přesné identifikace u 99,4 % izolátů (Garrigos *et al.* 2021a). Přínos doplnění dalších druhů a kmenů achromobakterů do výchozí databáze (verze 3.0, MBT DB-7854 MSP) zaznamenali i další autoři (Papalia *et al.* 2020b). Současná databáze (verze 11, DB-10833 MSP) je k dispozici na vyžádání u výrobce Bruker Daltonik GmbH. Využití MALDI-TOF MS s rozšířenou databází druhů achromobakterů by mohlo být významné pro budoucí rychlou a přesnou identifikaci druhů (Papalia *et al.* 2020b, Garrigos *et al.* 2021a).

Při využití běžných identifikačních souprav mohou být *Achromobacter* spp. chybně považovány za rody *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Ralstonia* nebo *Stenotrophomonas* (Spilker *et al.* 2012). Pro předběžnou identifikaci rodu *Achromobacter* je možné využít sekvenaci genů pro 16S rRNA (Filipic *et al.* 2017), avšak tato metoda rovněž není schopna odlišit jednotlivé druhy (Papalia *et al.* 2020a).

3.3.2 Druhová identifikace a molekulární typizace *Achromobacter* spp.

Identifikaci druhů achromobakterů lze realizovat za pomoci MLSA (multilokusová sekvenční analýza) a MLST (multilokusová sekvenční typizace). Obě metody využívají geny, které se v genomu vyskytují jen v jedné kopii. Pro účely MLSA bylo vybráno pět konzervovaných genů, konkrétně *atpD* (β -podjednotka ATP syntázy), *icd* (isocitrátdehydrogenáza), *recA* (rekombináza A) *rpoB* (β -podjednotka RNA polymerázy) a *tyrB* (transferáza aromatických aminokyselin) (Ridderberg *et al.* 2012). Pro MLST bylo vybráno

sedm genů – *nusA*, *rpoB*, *eno*, *gltB*, *lepA*, *nuoL* a *nrDA*. Tyto geny se na chromozomu *Achromobacter* spp. vyskytují pouze v jedné kopii. (Spilker *et al.* 2012). MLST je metoda charakterizace bakterií na základě sekvence lokusů kolem 6–10 housekeeping genů nebo jejich fragmentů. Genetická variabilita těchto genů vzniká náhodnými mutacemi, které se přenášejí do dalších generací a umožňují stanovit genetickou příbuznost. Avšak ve vzácných případech se může shodná mutace vyvinout i v nepříbuzných kmenech nezávislých na sobě. Sekvence se porovnávají s online databázemi známých alelických variant. Novým alelám se přiřazují numerická označení podle pořadí, v jakém byly objeveny. Na základě jedinečných kombinací alel se k profilům MLST přiřazují sekvenční (ST) typy. Typizace patogenních bakterií pomocí MLST má nepostradatelné využití v epidemiologii (Maiden 2006).

Pro druhovou identifikaci druhů *Achromobacter* se doporučuje využití sekvenace genu *nrDA* (Spilker *et al.* 2013, Bador *et al.* 2016), který kóduje alfa podjednotku enzymu ribonukleotid-difosfát reduktázy (Cools *et al.* 2016). Rozlišení *A. dolens* od *A. ruhlandii* je možné pouze pomocí fragmentu genu o délce sekvence 765 bp, narozdíl od 449 bp dlouhé sekvence používané pro MLST (Spilker *et al.* 2013, Bador *et al.* 2016).

Sekvenací genu *nrDA* bylo zjištěno, že u pacientů se nejčastěji vyskytuje *A. xylooxidans*, na čemž se různí autoři shodují (Coward *et al.* 2016, Filipic *et al.* 2017, Okoliegbe *et al.* 2020, Papalia *et al.* 2020a). Pro identifikaci druhu se dříve využívala i sekvenace genů *bla_{OXA}*, které jsou druhově specifické (Coward *et al.* 2016, Papalia *et al.* 2020a). Nicméně se ukázalo, že identifikace pomocí genů *bla_{OXA}* není dostatečná, v genomech některých kmenů nemusí být geny *bla_{OXA}* přítomny (Jeukens *et al.* 2017).

Za účelem zjištění epidemických souvislostí mezi infekcemi jednotlivých pacientů se provádí molekulární typizace izolovaných achromobakterů (Gabrielaite *et al.* 2021a). Epidemiologickou příbuznost jednotlivých izolátů *Achromobacter* spp. lze určit pomocí genotypové analýzy s využitím pulzní gelové elektroforézy, a to s použitím enzymu XbaI (Coward *et al.* 2016, Filipic *et al.* 2017) nebo XbaI a SpeI (Ridderberg *et al.* 2011). K analýze přenosu achromobakterových infekcí mezi pacienty lze využít celogenomovou sekvenaci, která je pro tuto analýzu nejvhodnější metodou. K identifikaci klonů je možné použít MLST s určením ST typu (Gabrielaite *et al.* 2021a) a pravděpodobně i MLSA, která byla původně zamýšlená pouze pro druhovou identifikaci (Ridderberg *et al.* 2012). Ke dni 27. 7. 2022 bylo v databázi PubMLST zaznamenáno 546 různých ST typů *Achromobacter* spp. (Jolley *et al.* 2018, https://pubmlst.org/bigddb?db=pubmlst_achromobacter_seqdef). Ve většině studií

zaměřených na epidemiologii *Achromobacter* spp. mezi pacienty s CF poukazuje diverzita kmenů na jejich enviromentální původ (Filipic *et al.* 2017). Nicméně v mnoha studiích autoři dospěli k závěru, že v určité míře dochází také k přenosu kmenů mezi CF pacienty (Pereira *et al.* 2011). Je znám epidemický kmen *A. xylosoxidans* ST-137 u pacientů s CF v Belgii (Cools *et al.* 2016, Garrigos *et al.* 2021b) a dánský hypermutátorový kmen *A. ruhlandii* DES (*Danish epidemic strain*) šířící se mezi pacienty s CF v Dánsku (Filipic *et al.* 2017, Garrigos *et al.* 2021b). V Brazílii byl zjištěn klon *A. xylosoxidans* totožný u 56 % pacientů v tamních centrech CF, zbývající izoláty byly geneticky heterogenní (Pereira *et al.* 2011). V ČR v současnosti není znám žádný epidemický kmen *Achromobacter* spp., nicméně z důvodu nedostatku údajů nelze jeho přítomnost vyloučit (výsledky vyhledávání „*epidemic Achromobacter Czech*“ na WoS, PubMed, Google Scholar, ke dni 5. 8. 2022).

Další metodou pro typizaci bakterií je infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR-spektroskopie, *Fourier transform infrared spectroscopy*) (Feng *et al.* 2020). Jedná se o fyzikálně-chemickou metodu, která je schopná analyzovat vibrační vlastnosti funkčních skupin látek. Při průchodu infračerveného záření se část této energie absorbuje a dojde ke změně vibračních stavů molekul vzorku (Ellis & Goodacre 2006). Pracuje ve střední infračervené oblasti (oblast v rozmezí vlnových délek 4 000 až 1 000 cm^{-1}), ve které jsou pozorovány dva hlavní typy vibrací. Těmi jsou vibrace podél chemických vazeb zahrnující změny délky vazeb (tzv. *stretching*, natahující vibrace) a vibrace podílející se na změnách vazebných úhlů (ohybové vibrace). Frekvence kmitání závisí na hmotnosti atomů a síle vazby, násobné vazby vykazují vyšší frekvenci vibrací. Na sílu vazby mezi dvěma atomy má vliv např. elektronegativita sousedních atomů nebo zapojení jednoho z atomů do vodíkového můstku (Berthomieu & Hienerwadel 2009). Výsledný infračervený profil je specifický pro jakoukoli chemickou či biochemickou látku. Metodu je možné využít ke studiu různých látek, od jednotlivých molekul až po buňky a tkáně, a to na základě analýzy sacharidů, lipidů, mastných kyselin, aminokyselin a proteinů. Vzhledem k významné interferenci vody je potřeba vzorky dehydratovat nebo od výsledku signál molekul vody odečíst (Ellis & Goodacre 2006).

Již od 50. let minulého století je známé, že různé bakterie vykazují různá infračervená spektra. Přestože je většina funkčních skupin látek v odlišných bakteriích identická a dává stejné signály, je možné vzájemně odlišit jednotlivé kmeny podle množství a rozložení různých funkčních skupin ve spektru (Schmitt & Flemming 1998). Některá infračervená spektra lze přiřadit k určitým vibračním profilům charakteristickým pro konkrétní chemické struktury. Spektrální rozsah od 2 800 do 3 000 cm^{-1} odpovídá charakteristické absorpci mastných kyselin

obsažených v buněčné membráně. V rozmezí 1 500 až 1 800 cm^{-1} dominují absorpční pásy proteinových amidů-I a amidů-II a rozsahu mezi 900 a 1 200 cm^{-1} se obvykle nachází mnoho pásů charakteristických pro polysacharidy a nukleové kyseliny. Pro typizaci kmene bývá nejvýznamnější interval mezi 800 a 1 300 cm^{-1} (Feng *et al.* 2020). FTIR-spektroskopie je metoda vhodná pro identifikaci bakterií a studium biofilmů. Její využití je na svém počátku, nicméně metoda skýtá mnohé možnosti a aplikace využití v klinických i výzkumných laboratořích nejen v mikrobiologii (Schmitt & Flemming 1998).

3.4 Faktory virulence a mechanismy adaptace

Za faktory virulence u *Achromobacter* spp. můžeme označit vlastnosti, které umožňují bakteriím přilnout, kolonizovat a následně infikovat dýchací cesty (Filipic *et al.* 2017). Jedná se o tvorbu peritrichních bičíků umožňujících motilitu bakterií. Zároveň pomáhají při tvorbě biofilmu a infikování hostitelských buněk (Swenson & Sadikot 2015). Bičíky umožňují achromobakterům tzv. swimming motilitu, další formy motility swarming ani twitching nebyly u *Achromobacter* spp. pozorovány (Jakobsen *et al.* 2013). Při testování schopnosti tvořit biofilm se izoláty od pacientů s CF a pacientů, kteří netrpí CF, významně neliší (Filipic *et al.* 2017). Podle jiných autorů dochází v průběhu chronické infekce dýchacích cest pacientů s CF ke snížení schopnosti tvořit biofilm (Ridderberg *et al.* 2015). Izoláty od pacientů s CF bývají méně pohyblivé a mají vyšší vazebnou afinitu ke kolagenu, mucinu a fibronektinu. Tyto vlastnosti mohou být důležité pro kolonizaci pacientů s CF, v jejichž plicích se kumuluje viskózní sekret způsobující náchylnost k bakteriálním infekcím. Snížená motilita kmenů u pacientů s CF může představovat konkurenční výhodu při vzniku infekce v dýchacích cestách. Podobně vyšší afinita k mucinu může vznikat jako adaptace na kumulaci viskózního sekretu v plicích (Filipic *et al.* 2017).

Za vlastnosti důležité pro přežití *Achromobacter* spp. v nepříznivém prostředí lze považovat velký genom bohatý na GC páry a odolnost vůči přítomnosti arzenu a dalších toxických kovů (Swenson & Sadikot 2015). Podle některých autorů se odolnost vůči těžkým kovům se vyskytuje společně s rezistencí vůči antibiotikům na základě zkřížené rezistence, korezistence nebo společné regulace exprese, jelikož mechanismus odolnosti vůči těžkým kovům je podobný mechanismu rezistence vůči antibiotikům. Těžké kovy se v důsledku lidské činnosti objevují stále častěji jako kontaminanty životního prostředí a mohou vyvolávat dlouhodobý selekční tlak na bakterie (Baker-Austin *et al.* 2006). Dříve se používaly také v dezinfekčních a antiseptických přípravcích, jako byly thiomersal, merbromin, metaphen a dusičnan fenyl-rtuťnatý obsahující rtuť (Khor & Jegathesan 1983). Jako faktory virulence lze

považovat i mechanismy rezistence (viz. následující kapitola 3.5) (Filipic *et al.* 2017), geny pro obranu před imunitním systémem hostitele (*brkB*) a geny pro invazi do hostitelských buněk (*cheW*, *cheY*). Mutace v genech pro transport iontů by mohly mít vliv na adaptaci na nedostatek železa v dýchacích cestách nebo na rezistenci zprostředkovanou efluxními systémy (Gabrielaite *et al.* 2021b). V genomu *Achromobacter* spp. jsou zastoupeny geny pro transport železa a fosfátové transportní látky. Siderofor alcaligin se vyznačuje vysokou afinitou k železu a je významný pro přežití rodu *Achromobacter* a dalších v prostředí s nedostatkem železa, kterým je např. lidské tělo (Li *et al.* 2013).

A. xylosoxidans společně s dalšími gramnegativními patogenními bakteriemi exprimuje Vi kapsulární polysacharid a lipopolysacharid vnější membrány (LPS) s O-antigenem (Veschetti *et al.* 2021). Vi kapsulární polysacharid zajišťuje adhezi k povrchům a ochranu před fagocytózou makrofágy, toxiny vnějšího prostředí a vysycháním (Swenson & Sadikot 2015, Veschetti *et al.* 2021). O-antigen je hlavním endotoxinem gramnegativních patogenů (Li *et al.* 2013), indukuje odpověď imunitního systému hostitele a tvorbu zánětlivých cytokinů (Veschetti *et al.* 2021). Zároveň chrání bakterii před nepříznivými vlivy okolního prostředí (Swenson & Sadikot 2015) a může se podílet na tvorbě biofilmu (Ridderberg *et al.* 2015). Schopnost adheze je nezbytnou podmínkou pro tvorbu biofilmu, kolonizaci dýchacích cest a jejich následnou infekci. Biofilm se podílí též na odolnosti vůči antibiotikům, jelikož účinné látky do biofilmu hůře pronikají (Swenson & Sadikot 2015). *A. xylosoxidans* může produkovat termostabilní cytotoxin, který je odlišný od endotoxinu (Mantovani *et al.* 2012) a je spojen se zvýšením tvorby prozánětlivých cytokinů (Veschetti *et al.* 2021).

Na virulenci se podílí také sekreční systémy typů II, III a VI (Jakobsen *et al.* 2013), které jako kanály či injekční jehly transportují substráty v podobě efektorových proteinů ven z buňky do cílového místa (Green & Mecsas 2016). Sekreční systém T2SS (typ II) tvoří obecnou sekretorickou dráhu GSP a podílí se na uvolňování extracelulárních toxinů a proteáz do okolí bakterií či hostitelských buněk (Jakobsen *et al.* 2013). Nejdůležitějším sekrečním systémem pro patogenitu *Achromobacter* spp. je T3SS (typ III). Dodává bakteriím schopnost infikovat hostitelské buňky efektorovými proteiny, podílí se na poškození alveol a následné zánětlivé reakci. T3SS systém se nalézá i u dalších bakterií způsobujících infekce u pacientů s CF, jako je *P. aeruginosa*, *Bordetella*, *Vibrio*, *Yersinia* či *Salmonella* (Swenson & Sadikot 2015). T3SS přítomný u *Achromobacter* spp. je geneticky nejvíce podobný T3SS pozorovanému právě u *Bordetella* spp. Substrátem pro T3SS je fosfolipáza A2, označovaná

jako AxoU. Odpovídající gen pro ni byl nalezen v genomu *A. xylosoxidans* a v makrofázích hostitele působí cytotoxicky (Pickrum *et al.* 2020).

Někteří zástupci rodu *Achromobacter* produkují také fosfolipázu C, enzym hydrolyzující fosfolipidy např. v surfaktantu v alveolech. Hydrolýza fosfolipidů surfaktantu pravděpodobně usnadňuje vznik pneumonie s konsolidací plicní tkáně (tvorba exsudátu v alveolech). Fosfolipáza C je významná pro virulenci druhů *P. aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* a *Clostridium perfringens* (Swenson & Sadikot 2015). Na základě celogenomové sekvenace bylo zjištěno, že rod *Achromobacter* je schopný produkce kolicinu V (Jakobsen *et al.* 2013). Kolicin V je protein působící cytotoxicky na některé konkurenční bakterie a mohl by napomáhat invazi bakterií do tkání (Swenson & Sadikot 2015). V genomu *Achromobacter* spp. se rovněž nalézá regulační gen *aepA*, jehož produkt ovlivňuje expresi celulázy a proteinázy (Jakobsen *et al.* 2013). Tyto enzymy se podílejí na invazi do sliznice hostitele Swenson & Sadikot 2015). Někteří autoři předpokládají u *A. xylosoxidans* přítomnost enzymů podílejících se na degradaci mRNA a proteinů, jako jsou endoribonukleázy a proteázy. Tyto enzymy mohou působit jako buněčné toxiny a poškozovat hostitelské buňky (Li *et al.* 2013). V genomu *A. xylosoxidans* byly nalezeny geny kódující hemolyziny, avšak jejich produkce nebyla fenotypově pozorována (Pickrum *et al.* 2020).

Přestože je rod *Achromobacter* primárně aerobní, některé klinické izoláty mohou využívat anaerobní dýchání pomocí denitrifikačního systému, který je podobný denitrifikačnímu systému *P. aeruginosa* (Swenson & Sadikot 2015). Denitrifikace umožňuje bakteriím přežít a růst v hypoxickém až anoxickém prostředí. Anaerobní podmínky nastávají ve viskózním sekretu dýchacích cest pacientů s CF z důvodu spotřeby kyslíku polymorfonukleáry. Některé kmeny *Achromobacter* spp. dokáží anaerobně redukovat dusitany a dusičnany přes oxid dusný až na plynný dusík. (Jakobsen *et al.* 2013). Oxid dusný byl nalezen i ve sputu pacientů s CF a chronickou infekcí *P. aeruginosa* (Kolpen *et al.* 2014). Oxid dusný je v rámci vyšetření FENO (Frakce vydechaného oxidu dusného) markerem zánětu dýchacích cest (Smith *et al.* 2015). Schopnost denitrifikace byla zjištěna např. u kmene *A. xylosoxidans* NH44784-1996 (Jakobsen *et al.* 2013).

V průběhu adaptace achromobakterů na dýchací cesty pacientů s CF může docházet ke konvergentní evoluci genů podílejících se na virulenci (Ridderberg *et al.* 2015). Kmeny se sníženou virulencí mohou být obtížněji rozpoznávány imunitním systémem (Veschetti *et al.*

2021). Bylo zjištěno, že geny v genomu *Achromobacter* spp. jsou častěji redukovány než získávány (Gabrielaite *et al.* 2021b).

3.5 Citlivost a rezistence *Achromobacter* spp. vůči antibiotikům

Rutinní screeningové testování antimikrobiální citlivosti probíhá pomocí diskové difuzní metody. Pokud nejsou známé klinické breakpointy pro *Achromobacter* spp., využívají se breakpointy pro *P. aeruginosa*. Přesnější metodou testování antimikrobiální citlivosti je určení MIC (minimální inhibiční koncentrace), což je nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibuje viditelný růst bakterií. Pokud opět neznáme klinické breakpointy pro *Achromobacter* spp., vyhodnocení je možné provést pomocí breakpointů pro ostatní non-*Enterobacteriaceae*. Někdy se MIC určuje jen v případě zjištění rezistence v diskovém difuzním testu (Filipic *et al.* 2017).

U typového kmene *A. xylosoxidans* ATCC 27061 se při testování citlivosti prokázala rezistence tohoto kmene k ampicilinu, chloramfenikolu, kolistinu, erytromycinu, gentamicinu, kanamycinu, novobiocinu, penicilinu, streptomycinu a tetracyklinu. Zároveň se zjistilo, že je citlivý ke kyselině nalidixové a polymyxinu B (Yabuuchi & Ohya 1971). Kmeny *A. xylosoxidans* jsou rezistentní k úzkospektrým penicilinům a některým cefalosporinům, citlivost vůči piperacilinu a karbapenemům se mezi jednotlivými kmeny liší (Jakobsen *et al.* 2013). Rezistence vůči antibiotikům může být u achromobakterů podmíněna mnoha různými mechanismy. *A. xylosoxidans* kóduje v genomu alespoň 50 konzervovaných genů souvisejících s přirozenou rezistencí. Mezi ně patří β -laktamázy tříd A až D, několik typů efluxních pump a produkce modifikujících enzymů, jako jsou aminoglykosid *N*-acetyltransferáza a aminoglykosid *O*-fosfotransferáza, chloramfenikol *O*-acetyltransferáza skupiny B, dihydrofolátreduktáza, rRNA methyláza a undekaprenyl-pyrofosfát fosfatáza (Hu *et al.* 2015). I v případě, že kmen obsahuje v genomu gen rezistence, nemusí být daný gen exprimován (Jeukens *et al.* 2017). *A. xylosoxidans* nese rovněž geny pro přirozenou rezistenci vůči aminoglykosidům a aztreonamu (Hu *et al.* 2015, Swenson & Sadikot 2015, Filipic *et al.* 2017), k tetracyklinům a některým penicilinům a cefalosporinům (Swenson & Sadikot 2015) kromě ceftazidimu (Hu *et al.* 2015). Některé kmeny *Achromobacter* spp. jsou k aminoglykosidům citlivé (Filipic *et al.* 2017). Také některé izoláty *A. xylosoxidans* kódující metalo- β -laktamázy (dále jen MBL) třídy B (běžně se podílející na rezistenci vůči karbapenemům) a enzym inaktivující chloramfenikol mohou být citlivé ke karbapenemům i chloramfenikolu (Hu *et al.* 2015). Častá je rezistence *Achromobacter* spp. vůči fluorochinolonům, jako je ciprofloxacin a levofloxacin (Okoliegbe *et al.* 2020). Ve srovnání s izoláty z prostředí bývají klinické izoláty

rezistentní vůči více skupinám antibiotik. Enviromentální kmeny *A. xylosoxidans* mohou být citlivé vůči ceftazidimu, cefepimu, piperacilinu, karbapenemům, sulfonamidům, fluorochinolonům, tetracyklinům a kolistinu. Oproti tomu klinické izoláty od pacientů s chronickou infekcí bývají často k většině ze zmíněných antibiotik rezistentní, a to především k fluorochinolonům (Isler *et al.* 2020). Většina klinických izolátů si zachovává citlivost ke karbapenemům, piperacilin-tazobaktamu a kotrimoxazolu (Gabrielaite *et al.* 2021a).

Získané geny rezistence se nacházejí na mobilních genetických elementech (MGE), což jsou úseky DNA schopné přemístění se v rámci jednoho i více chromozomů a mohou se tak šířit do dalších bakterií. Součástí MGE mohou být mimo jiné geny pro některé β -laktamázy, jako jsou např. MBL (Hu *et al.* 2015). Některé geny pro rezistenci objevené u *A. xylosoxidans* jsou homologní se sekvencemi rezistenčních genů dalších patogenů vyskytujících se u pacientů s CF. Např. geny pro efluxní systém AxyXY-OprZ u *A. xylosoxidans* mají své homology zejména s geny nalezenými v *P. aeruginosa* a *Burkholderia pseudomallei* (Bador *et al.* 2013). Tato homologie zvyšuje pravděpodobnost horizontálního přenosu genů mezi patogeny (Swenson & Sadikot 2015). Současně bylo zjištěno, že v genomu *A. xylosoxidans* jsou kódované i nové β -laktamázy, které ještě nebyly plně charakterizovány (Hu *et al.* 2015).

3.5.1 Mechanismy rezistence *Achromobacter* spp. vůči antibiotikům

Mechanismy rezistence *Achromobacter* spp. vůči antibiotikům nejsou v současnosti plně charakterizovány (Magallon *et al.* 2021). Patří mezi ně zejména efluxní systémy snižující koncentraci antibiotika v buňkách jejich transportem do extracelulárního prostředí a β -laktamázy inaktivující antibiotika v okolí buněk (viz. dále) (Isler *et al.* 2020). Bylo zjištěno, že rezistence achromobakterů vůči fluorochinolonům není primárně způsobena změnou cílové struktury pro působení antibiotika, jak tomu bývá u jiných bakterií. (Magallon *et al.* 2021). Dalším mechanismem rezistence využívaným bakteriemi je změna permeability membrány, díky které antibiotikum hůře proniká do buňky. Bylo zjištěno, že na rezistenci *P. aeruginosa* vůči karbapenemům se nepřímou úměrou podílí přítomnost porinu vnější membrány OprD, kterým pronikají karbapenemy do citlivých izolátů. Kmeny *P. aeruginosa*, které postrádají protein OprD, bývají vůči karbapenemům rezistentní. U *Achromobacter* spp. však nebyl nalezen homolog proteinu OprD, z čehož autoři usuzují, že průnik karbapenemů do achromobakterů probíhá skrz jiné poriny než je typ OprD (Hu *et al.* 2015).

3.5.1.1 Beta-laktamázy a jejich průkaz

Achromobacter spp. má na chromozomu kódované β -laktamázy podobné OXA-114 (Isler *et al.* 2020). OXA-114 je úzkospektrá β -laktamáza třídy D (Hu *et al.* 2015). Hydrolyzuje benzylpenicilin (penicilin G) a cefalosporiny nižších generací, ale cefalosporiny s rozšířeným spektrem (jako ceftazidim, cefotaxim, cefepim) již nejsou jejím substrátem. U OXA-114 byla zaznamenána i slabá aktivita proti imipenemu (Isler *et al.* 2020) a tikarcilinu (Hu *et al.* 2015). Hydrolyzuje také piperacilin, ale byla nalezena i u kmenů *Achromobacter* spp. citlivých k piperacilinu. Vzhledem k podobným hodnotám MIC samotného piperacilinu a jeho kombinace s tazobaktamem pravděpodobně není tazobaktamem inhibována (Isler *et al.* 2020).

U některých izolátů *Achromobacter* spp. jsou přítomné získané β -laktamázy, jako jsou ESBL (β -laktamázy širokého spektra), MBL (Filipic *et al.* 2017, Isler *et al.* 2020) a AmpC (Isler *et al.* 2020). ESBL jsou kódovány na plasmidech a jejich produkce je jednou z hlavních příčin rezistence vůči β -laktamovým antibiotikům u gramnegativních bakterií (Peymani *et al.* 2017). Přítomnost MBL patří společně s nescifickými efluxními pumpami k hlavním mechanismům rezistence vůči karbapenemům, jako je imipenem a meropenem (Swenson & Sadikot 2015, Isler *et al.* 2020). Jako screeningové metody pro zjištění produkce β -laktamáz lze využít difuzní testy založené na pozorování fenotypu (Filipic *et al.* 2017). Pro screening produkce ESBL se používá test synergie dvou disků (DDST), který spočívá v pozorování interakce antibiotických disků obsahujících aztreonam, ceftazidim, ceftriaxon a cefotaxim s diskem napuštěným amoxicilin-klavulanátem. Zvětšení inhibiční zóny jakéhokoliv z testovaných antibiotik směrem k disku s inhibitorem je považováno za možnou produkci ESBL. Dalším screeningovým testem je fenotypový konfirmační test, ve kterém se používají disky obsahující cefalosporin (ceftazidim nebo cefotaxim) samostatně a v kombinaci a kyselinou klavulanovou. Pokud je průměr zóny s klavulanátem alespoň o 5 mm větší, testovaný kmen může být producentem ESBL (Tsering *et al.* 2009). Pro detekci produkce MBL lze využít difuzní test s disky s imipenemem a s jeho kombinací s EDTA. Je založen na inhibici MBL chelatačními činidly, mezi které spadá i EDTA. Pokud zkoumaný kmen produkuje MBL, vytvoří se kolem disku imipenem/EDTA inhibiční zóna alespoň o 7 mm větší (platí pro *Pseudomonas* spp.) v porovnání se samotným imipenemem (Yong *et al.* 2002).

Při pozitivitě diskových difuzních testů se možnost produkce β -laktamáz ověřuje molekulárními metodami využívajícími PCR k detekci genů kódujících β -laktamázy (Filipic *et al.* 2017). Z genů pro ESBL se jedná především o geny *bla*_{CTX-M} a *bla*_{VEB-1}, pro AmpC byly nalezeny geny *bla*_{AmpC} a *bla*_{CMY2} (Isler *et al.* 2020). Enzym CTX-M se podílí na rezistenci

vůči penicilinům a cefalosporinům první až třetí generace. Podle aminokyselinových sekvencí je lze rozdělit do pěti podskupin (Peymani *et al.* 2017). VEB-1 spadá do β -laktamáz třídy A a zajišťuje vysokou úroveň rezistence vůči cefalosporinům (především vůči ceftazidimu a cefepimu) a k monobaktamům (Alikhani *et al.* 2014). AmpC je skupina chromozomálních inducibilních β -laktamáz, která může způsobovat rozšířenou rezistenci vůči β -laktamovým antibiotikům s výjimkou karbapenemů (Shin *et al.* 2005). U *Achromobacter* spp. mohou být přítomny celosvětově nejběžnější MBL *bla*_{IMP} a *bla*_{VIM}, které nejsou inhibovány v současnosti používanými inhibitory MBL (Isler *et al.* 2020). U achromobakterů byl také zaznamenán gen *bla*_{KPC} (Furlan & Stehling 2017), který kóduje serinovou karbapenemázu třídy A produkovanou především *Klebsiella pneumoniae* (Ghasemnejad & Amirmozafari 2019). Rezistence vůči karbapenemům není zprostředkována pouze MBL, ale i dalšími mechanismy, jako je efluxní pumpa AxyXY-OprZ, možná zvýšená exprese předpokládané β -laktamázy *bla*_{AXC} či přítomnost zatím neidentifikované β -laktamázy. U izolátů *A. xylosoxidans* z Libye byla zjištěna vzácnější Tripoli MBL (TMB), která s nižší účinností hydrolyzuje cefalosporiny a karbapenemy a má své homology u *P. aeruginosa* (Isler *et al.* 2020).

3.5.1.2 Efluxní pumpy

U rodu *Achromobacter* najdeme dva hlavní nespecifické efluxní systémy typu RND (*resistance-nodulation-division*) (Hu *et al.* 2015, Jeukens *et al.*, 2017). Efluxní pumpa AxyABM zajišťuje transport cefalosporinů, aztreonamu (Swenson & Sadikot 2015, Isler *et al.* 2020), fluorochinolonů a chloramfenikolu ven z buňky (Bador *et al.* 2011 Swenson & Sadikot 2015, Jeukens *et al.* 2017). Je podobná MexAB-OprM nalezené u *P. aeruginosa*, se kterou sdílí společné substráty, ale na rozdíl od ní nedokáže z buňky odstranit cefepim a meropenem. AxyABM ani MexAB-OprM nedokáží transportovat z buňky imipenem a aminoglykosidy (Bador *et al.* 2011). AxyABM byla nalezena ve všech genomech *Achromobacter* spp. Při její *in vitro* inhibici se citlivost k cefalosporinům ani k aztreonamu neobnoví, inhibice vede pouze ke snížení MIC některých antibiotik. Nejedná se tedy o jediný mechanismus rezistence vůči cefalosporinům a aztreonamu (Isler *et al.* 2020).

Efluxní systém AxyXY-OprZ má širší spektrum účinku než AxyABM (Isler *et al.* 2020). Je důležitý pro eflux zejména aminoglykosidů, dále se zvyšuje míru k rezistence na cefepim, tetracykliny, karbapenemy (Hu *et al.* 2015, Swenson & Sadikot 2015, Isler, *et al.* 2020), fluorochinolony a erytromycin (Hu *et al.* 2015, Isler *et al.* 2020). Je hlavním mechanismem rezistence vůči aminoglykosidům, zajišťuje vysokou přirozenou rezistenci u *Achromobacter* spp. k této skupině antibiotik. *In vitro* inhibicí AxyXY-OprZ dojde

k obnovení citlivosti vůči aminoglykosidům, tetracyklinu a tigecyklinu, u imipenemu, meropenemu, fluorochinolonů, ceftazidimu a cefepimu nastane pouze snížení MIC bez obnovení citlivosti (Isler *et al.* 2020). Podle některých studií chybí efluxní pumpa AxyXY-OprZ u *Achromobacter* spp. citlivých k aminoglykosidům (*A. animicus*, *A. mucicolens*, *A. piechaudii*, *A. spanius*) a vyskytuje se pouze u *Achromobacter* spp. s fenotypovou rezistencí na aminoglykosidy (*A. aegrifaciens*, *A. denitrificans*, *A. dolens*, *A. insolitus*, *A. insuavis*, *A. marplatensis*, *A. ruhlandii*, *A. xylosoxidans*) (Bador *et al.* 2016). Přesto však byla AxyXY-OprZ nalezena ve všech genomech *Achromobacter* spp. (Jeukens *et al.* 2017). AxyXY-OprZ je podobná s efluxním systémem MexXY/OprM přítomným u *P. aeruginosa*. MexXY/OprM odstraňuje z buňky podobné substráty, ale efluxní systém u *Achromobacter* spp. je účinnější (Swenson & Sadikot 2015).

Dalšími efluxními systémy nalezenými u *A. xylosoxidans* jsou TetA podílející se na efluxu tetracyklinů (Jakobsen *et al.* 2013) a AxyEF-OprN (Magallon *et al.* 2021) transportující fluorochinolony. TetA se běžně vyskytuje i u jiných gramnegativních patogenů (Jakobsen *et al.* 2013).

3.6 Léčba infekcí způsobených *Achromobacter* spp.

Při plicní exacerbaci se nasazují širokospektrá antibiotika ve vysokých dávkách po dobu minimálně 14 dnů (www.novorozeneckyscreening.cz), která však většinou nevede k eliminaci patogenu, ale pouze ke zmírnění symptomů a zalezení akutního stavu (Horsley & Jones 2012). Antibiotika by se měla předepisovat pouze na základě mikrobiologického vyšetření sputa či bronchoalveolární laváže a citlivostního profilu izolovaného patogenu. U těžších případů se indikuje kombinace antibiotik (Fila 2021). Výběr vhodného antibiotika při léčbě je omezen z důvodu značné přirozené i získané rezistence *Achromobacter* spp. (Filipic *et al.* 2017). Mezi nejčastěji používané antibiotické režimy používané při achromobakterových infekcích patří třítýdenní terapie inhalačním kolistinem v kombinaci s amoxicilin-klavulanátem. Je také možné zvolit intravenózní léčbu piperacilin-tazobaktamem, meropenemem nebo ceftazidimem, v kombinaci s tobramycinem a kotrimoxazolem (Gabrielaite *et al.* 2021a). Prokazování efektivity nových antibiotik při exacerbaci je problematické, neboť z etického pohledu nelze porovnávat účinnou látku s placebem z důvodu významného zdravotního rizika pro pacienty v případě neposkytnutí adekvátní léčby. Z toho důvodu se porovnávají různé antibiotické režimy mezi sebou, případně se přidávají další antibiotika ke konvenčnímu antibiotickému režimu. Je potřeba posoudit bezpečnost a účinnost antibiotických režimů při exacerbaci u pacientů s CF při chronických infekcích (Horsley & Jones 2012).

Mezi *in vitro* neúčinnější antibiotika proti *Achromobacter* spp. patří kotrimoxazol (Isler *et al.* 2020, Okoliegbe *et al.* 2020), piperacilin/tazobaktam a minocyklin. Na úrovni druhů se projevují rozdíly v citlivosti k některým antibiotikům, jako jsou aminoglykosidy (amikacin, gentamicin, tobramycin), fluorochinolony (ciprofloxacin, levofloxacin), tetracykliny (doxycyklin, minocyklin) a tikarcilin/klavulanát. Naopak mezidruhová rozdílnost v citlivosti nebyla pozorována na aztreonam, chloramfenikol, kolistin, kotrimoxazol, ceftazidim a piperacilin/tazobaktam (Okoliegbe *et al.* 2020). *Achromobacter* spp. bývá citlivý i k samotnému piperacilinu a ke karbapenemům (Almuzara *et al.* 2010, Filipic *et al.* 2017, Isler *et al.* 2020), účinný může být také ceftazidim (Isler *et al.* 2020). Meropenem podle některých autorů vykazuje lepší výsledky než imipenem (Filipic *et al.* 2017), podle jiných studií bývá *Achromobacter* spp. častěji citlivý k imipenemu než k meropenemu (Isler *et al.* 2020, Okoliegbe *et al.* 2020). Někdy se zaznamená vyšší účinnost imipenemu v porovnání s meropenemem u *P. aeruginosa*, což je způsobeno nadměrnou expresí *mexAB* genů pro efluxní systém (Isler *et al.* 2020).

Při *in vitro* testování účinnosti β -laktamových antibiotik v kombinaci s inhibitory β -laktamáz proti *Achromobacter* spp. vykazoval meropenem/vaborbaktam jen mírně vyšší aktivitu než samostatný meropenem. Druhou nejefektivnější kombinací byl piperacilin/tazobaktam (Caverly *et al.* 2020), ale jak již bylo zmíněno, piperacilin byl účinný i samostatně bez inhibitoru (Almuzara *et al.* 2010, Filipic *et al.* 2017, Isler *et al.* 2020). Dobrou antimikrobiální aktivitu vykazoval také ceftazidim, u kterého bylo dosaženo srovnatelných výsledků samostatně a s použitím inhibitoru avibaktamu (Caverly *et al.* 2020). Vzhledem k podobné účinnosti kombinací β -laktamových antibiotik s inhibitory β -laktamáz se předpokládá, že zmíněné běžně používané inhibitory nejsou substráty pro β -laktamázy produkované *Achromobacter* spp. (Isler *et al.* 2020).

Na slibné výsledky poukazuje možnost fágové terapie. Při použití specifických fágů pro *Achromobacter* spp. v průběhu dvacetidenní terapie se čtvrtletním opakováním po dobu jednoho roku došlo ke zlepšení zdravotního stavu pacienta. Nicméně pro posouzení účinnosti fágové terapie by bylo potřeba posoudit výsledky terapie u více pacientů (Isler *et al.* 2020).

Podobně jako u jiných infekcí je zde zcela zásadní prevence. Je potřeba zabránit přenosu *Achromobacter* spp. mezi pacienty v centrech CF a dalších zdravotnických zařízeních. K tomu je nezbytné, aby pacienti s CF dodržovali doporučený hygienicko-epidemický režim (Horsley & Jones 2012, Fila 2014).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Sputa a izoláty *Achromobacter* spp.

V rámci studie byly analyzovány časosběrné izoláty *Achromobacter* spp. (n=24, tabulka 1) od devíti pacientů s cystickou fibrózou navštěvující Centrum CF při FN Motol. Izoláty byly shromažďovány v období mezi květnem 2011 až zářím 2012 a dále od února 2021 do ledna 2022, nicméně lékařské a laboratorní záznamy jsme měli k dispozici po dobu navštěvování Centra CF při FN Motol vybranými pacienty. Retrospektivní izoláty jsme měli k dispozici ve formě zamražené kultury. Prospektivní izoláty jsme získali izolací bakterií ze sputa pacientů, kteří v průběhu studie navštívili toto centrum. Dále jsme pro kontrolu analyzovali typové kmeny jednotlivých druhů *Achromobacter*, z České sbírky mikroorganismů (CCM) z Ústavu experimentální mikrobiologie Masarykovy univerzity (tabulka 2).

Tabulka 1. Analyzované izoláty od jednotlivých pacientů.

Pacient č.	Počet získaných izolátů od pacienta	Období sběru izolátů
1	4	10,1 let
2	4	9,9 let
3	4	10,7 let
4	3	7,5 měsíců
5	3	7,2 měsíců
6	3	12,1 měsíců
7	1	-
8	1	-
9	1	-

Tabulka 2. Typové kmeny *Achromobacter* spp., vypracováno podle <https://ccm.sci.muni.cz/katalog-kultur/bakterie-a-archaea/bakterie/TAXB1>.

Typový kmen	Druh	Popsán	Zdroj izolátu
CCM 2741 ^T	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	(ex Yabuuchi & Ohyama 1971) Yabuuchi & Yano 1981	ušní výtok
CCM 2986 ^T	<i>Achromobacter piechaudii</i>	(Kiredjian <i>et al.</i> 1986) Yabuuchi <i>et al.</i> 1998VP	hltn
CCM 3427 ^T	<i>Achromobacter denitrificans</i>	(Rüger & Tan 1983) Coenye <i>et al.</i> 2003VP	půda
CCM 7182 ^T	<i>Achromobacter insolitus</i>	Coenye <i>et al.</i> 2003VP	rána na noze
CCM 7183 ^T	<i>Achromobacter spanius</i>	Coenye <i>et al.</i> 2003VP	krev
CCM 7494 ^T	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	(Packer & Vishniac 1955) Yabuuchi <i>et al.</i> 1998VP	půda
CCM 7608 ^T	<i>Achromobacter marplatensis</i>	Gomila <i>et al.</i> 2011VP	půda kontaminovaná pentachlorfenolem (Argentina)

4.1.2 Kultivační média

V této práci byla použita kultivační média buďto již připravená výrobcem, nebo jsme si je připravovali z práškových dehydratovaných směsí. Jejich přehled je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3. Použitá kultivační média a jejich příměsi.

Název	Popis	Výrobce
AGAR BACTERIOLOGICAL (AGAR NO. 1)	Čistý agar (prášková směs k přípravě)	Oxoid™
BRAIN HEART INFUSION	BHI bujón (prášková směs k přípravě)	Oxoid™
COLUMBIA AGAR WITH SHEEP BLOOD	Krevní agar (na Petriho misce)	Oxoid™
Glycerin bezvodý p.a.	Glycerol	Penta Chemicals
MacConkey Agar No 3	MacConkey agar (na Petriho misce)	Oxoid™
Mueller-Hinton Agar	MH agar (na Petriho misce)	Oxoid™
MUELLER-HINTON AGAR	MH agar (prášková směs k přípravě)	Oxoid™
TRYPTONE SOYA AGAR	TSA agar (prášková směs k přípravě)	Oxoid™

4.1.3 Chemikálie a diagnostické a izolační soupravy

4.1.3.1 Antibiotika

Pro kvalitativní testování antibiotické citlivosti byly použity antibiotické disky obsahující jednotlivá antibiotika či jejich kombinaci s inhibítorem β -laktamázy. Název každého antibiotika včetně jeho obsahu v disku (μg) a zkratky je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4. Použité antibiotické disky.

Zkratka	Název	Výrobce
CZA14C	CEFTAZIDIME 10 μg AVIBACTAM 4 μg	Mast Group Ltd.
C/T40C	CEFTOLOZANE 30 μg TAZOBACTAM 10 μg	Mast Group Ltd.
TGC 15	TIGECYCLINE 15 μg	Oxoid™
MEM 10	MEROPENEM 10 μg	Oxoid™
IPM 10	IMIPENEM 10 μg	Oxoid™
SAM 20	AMPICILLIN / SULBACTAM 20 μg	Oxoid™
SXT 25	SULPHAMETHOXAZOLE / TRIMETHOPRIM 25 μg	Oxoid™
CT 10	COLISTIN SULPHATE 10 μg	Oxoid™
CN 10	GENTAMICIN 10 μg	Oxoid™
TOB 10	TOBRAMYCIN 10 μg	Oxoid™
TZP 36	PIPERACILLIN / TAZOBACTAM 30:6 36 μg	Oxoid™
CAZ 10	CEFTAZIDIME 10 μg	Oxoid™
AK 30	AMIKACIN 30 μg	Oxoid™
CIP 5	CIPROFLOXACIN 5 μg	Oxoid™
LEV 5	LEVOFLOXACIN 5 μg	Oxoid™
FEP 30	CEFEPIME 30 μg	Oxoid™
SCF 105	SULBACTAM / CEFOPERAZONE 105 μg	Oxoid™

4.1.3.2 Diagnostické a izolační soupravy

Diagnostické a izolační soupravy použité v této práci jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5. Diagnostické a izolační soupravy použité pro: 1 – purifikaci PCR produktu, 2 – purifikaci knihoven, 3 – purifikaci po sekvenační reakci, 4 – sekvenaci genu *nrdA*, 5 – hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF, 6 – celogenomovou sekvenaci, 7 – FTIR-spektroskopii, 8 – izolaci DNA, 9 – gelovou elektroforézu.

Název	Výrobce
Agencourt® AMPure XP ^{1,2}	Beckman Coulter
Agencourt® CleanSEQ ³	Beckman Coulter
BigDye® Direct Sanger Sequencing Kit ⁴	Thermo Fisher Scientific
HCCA portioned matrix for MALDI-TOF MS ⁵	Bruker Daltonik GmbH
High-Sensitivity DNA Library Preparation Kit ⁶	Illumina®
IR Biotyper Kit ⁷	Bruker Daltonik GmbH
MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification Kit (Cat. No. MC85200) ⁸	Lucigen Corporation
Nextera XT DNA Library Preparation Kit ⁶	Illumina®
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit ⁶	Thermo Fisher Scientific
UMD-SelectNA™ ⁹	Molzym GmbH & Co. KG

4.1.3.3 Chemikálie

Seznam chemikálií použitých v diplomové práci je uveden v tabulce 6.

Tabulka 6. Chemikálie soupravy použité pro: 1 – izolaci DNA, 2 – hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF 3 – purifikaci PCR produktu, 4 – purifikaci knihoven, 5 – purifikaci po sekvenační reakci, 6 – PCR, 7 – sekvenaci genu *nrdA*, 8 – FTIR-spektroskopii, 9 – testování antibiotické citlivosti, 10 – gelovou elektroforézu.

Název	Výrobce
2-Propanol ¹	Carl Roth
Acetonitril LC-MS CHROMASOLV® ²	Honeywell
Aptamer Hot Start Master Mix ⁶	Top-Bio, s.r.o.
Ethanol 96% p.a. ^{1,3,4,5,8}	Penta Chemicals
Fyziologický roztok ^{1,9}	DULAB s.r.o.
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10 000X in Water ¹⁰	Biotium
Chelex® 100 Resin ¹	Bio-Rad Laboratories
PCR ultra čistá voda ⁶	Top-Bio, s.r.o.
Pufť TBE 50% pH 8,3 ¹⁰	Lékárna FN Motol, Praha 5
SeaKem® LE Agarose ¹⁰	Lonza
Trifluoroacetic acid 99,5% for biochemistry ²	Acros Organics B.V.B.A.
Water for injection ^{2,7,8}	Fresenius Kabi s.r.o.
Water LC-MS CHROMASOLV® ²	Sigma-Aldrich s.r.o.

4.1.3.4 Soupravy a chemikálie pro elektronovou mikroskopii

Elektronová mikroskopie byla realizována ve spolupráci se Státním zdravotním ústavem (SZÚ) Praha v Národní referenční laboratoři pro průkaz infekčních agens elektronovou mikroskopií. Z důvodu zpracování této části studie na odděleném pracovišti a používání specifických chemikálií jsou použité chemikálie a soupravy uvedeny v samostatné tabulce 7.

Tabulka 7. Chemikálie a soupravy pro elektronovou mikroskopii.

Název	Popis	Výrobce
Alcian Blue 8GX	alcianová modř	Sigma-Aldrich s.r.o.
Ammonium molybdate tetrahydrate	molybdenan amonný tetrahydrát	Sigma-Aldrich s.r.o.
Aqua pro injectione	voda na injekci	B. Braun Melsungen AG
Ethanol for molecular biology	ethanol	Sigma-Aldrich s.r.o.
Fyziologický roztok	fyziologický roztok	DULAB s.r.o.
Glutaraldehyde solution G5882	glutaraldehyd	Sigma-Aldrich s.r.o.
Hydrochloric acid	kyselina chlorovodíková	Sigma-Aldrich s.r.o.
Kyselina octová	kyselina octová	Penta Chemicals
Lead Citrate (Reynolds)	citrát olovnatý	Delta Microscopies
Osmium tetroxide solution 75632	oxid osmičelý	Sigma-Aldrich s.r.o.
Sodium cacodylate trihydrate	kakodylan sodný trihydrát	Sigma-Aldrich s.r.o.
Sodium hydroxide	hydroxid sodný	VWR International s.r.o.
Spurr Low Viscosity Embedding Kit	pryskyřice Spurr	Sigma-Aldrich s.r.o.
Uranyl acetate dihydrate	uranyl acetát	Merck KGaA

4.1.3.5 Primery

Druhou identifikaci druhů *Achromobacter* spp. jsme provedli pomocí sekvenace genu *nrdA*. Forward a reverse primery použité pro amplifikaci a sekvenaci genu *nrdA* jsou uvedeny v následující tabulce 8.

Tabulka 8. Forward a reverse primer pro amplifikaci a sekvenaci genu *nrdA*.

Primer	Sekvence 5'→3'	Reference
nrdA_F	GAACTGGATTCCCGACCTGTTC	Spilker <i>et al.</i> , 2012)
nrdA_R	TTCGATTGACGTACAAGTTCTGG	

4.2 Metody

4.2.1 Zpracování klinického materiálu a identifikace izolátu na úrovni rodu

Klinickým materiálem pro tuto studii bylo odkašlané sputum pacientů s cystickou fibrózou. Sterilní jednorázovou kličkou jsme inokulovali sputum na krevní a MacConkey agar a kultivovali 24–48 hodin v termostatu při teplotě 37 °C. Suspektní kolonie jsme izolovali a provedli předběžnou identifikaci pomocí systému MALDI-TOF MS. Pro identifikaci hmotnostní spektrometrií jsme si předem připravili roztok MALDI Matrice obsahující matici (HCCA matrix portioned), 50% acetonitril, kyselinu trifluoroctovou a deionizovanou vodu. Následně jsme jednu kolonii z agaru rozetřeli párátkem na terčík ocelové destičky, překryly 1 µl roztoku MALDI Matrice a nechali uschnout. Acetonitril s kyselinou trifluoroctovou slouží v roztoku jako organické rozpouštědlo k extrakci proteinů z mikroorganismů. Destičku se vzorky jsme analyzovali v přístroji MALDI Biotyper™ a vyhodnotili pomocí příslušné databáze IVD MALDI Biotyper (verze 11, 10833 MSP, Bruker Daltonik GmbH). Software na základě korelace mezi analyzovaným proteinovým hmotnostním spektrem a profily v databázi vypočítá logaritmickou hodnotu skóre v intervalu od 0 do 3. Pravděpodobnému druhu studované bakterie odpovídá hodnota skóre $\geq 2,0$. Podrobnější postup je uveden v manuálu pro IVD MALDI Biotyper.

Kulturu *Achromobacter* spp. jsme zamrazili a uchovávali při teplotě -80 °C pro další analýzy. Jako kryokonzervační médium jsme použili BHI bujon s bezvodým glycerolem (viz. kapitola 4.1.2 Kultivační média) v poměru 1:1 (v/v). Před každou analýzou jsme izoláty inokulovali na MH agar a kultivovali 24–48 hodin v termostatu při teplotě 37 °C.

4.2.2 Molekulární identifikace a typizace

Druhovou identifikaci izolátů pomocí sekvenace genu *nrdA* jsme provedli u všech klinických izolátů (n=24) a pro kontrolu metody i u typových kmenů (n=7). Postup práce byl rozdělen na izolaci DNA, PCR a sekvenaci genu *nrdA*. Typizace byla provedena metodou FTIR pro všechny klinické izoláty (n=24) a určením ST typu pomocí MLST pro časosběrné izoláty šesti pacientů (č. 1–6; n=21). Profil MLST byl získán z dat celogenomového sekvenování.

4.2.2.1 Izolace DNA

DNA izolátů vybraných k celogenomové sekvenaci jsme izolovali pomocí soupravy *MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification Kit* (Cat. No. MC85200). Po 48 hodinách kultivace na krevním agaru jsme jednu kolonii resuspendovali ve fyziologickém roztoku

a centrifugovali při 13,5 RCF po dobu 5 minut. Z mikrozkušavky jsme odstranili supernatant a buněčný sediment důkladně homogenizovali. Následně jsme ke vzorku přidali lyzační roztok (*Tissue and Cell Lysis Solution*) s proteinázou K. Za občasného promíchání jsme nechali vzorek inkubovat při teplotě 65 °C, poté byla směs ochlazena na teplotu 37 °C. Vzorek jsme inkubovali s RNázou a poté prudce ochladili na ledu. Přidáním roztoku *MPC Protein Precipitation Reagent* jsme vysráželi proteiny obsažené ve vzorku. Směs jsme centrifugovali při 10 RCF po dobu 10 minut, abychom ze směsi oddělili supernatant obsahující DNA. Následně jsme DNA ze supernatantu vysráželi pomocí isopropanolu a centrifugovali při 4 °C při 10 RCF po dobu 10 minut, aby se vytvořil pelet DNA. Odstranili jsme isopropanol, pelet dvakrát opláchli 70% ethanolem a po důkladném odstranění ethanolu resuspendovali pelet v TE puftru. Podrobnější popis je popsán výrobcem zmíněné soupravy.

Pro účely sekvenace genu *nrdA* u zbývajících izolátů pacientů zahrnutých do studie jsme zvolili metodu izolace DNA chelexem. Izoláty jsme přenesli z MH agaru na krevní agar a nechali kultivovat 48 hodin při teplotě 37 °C. Následně jsme vždy jednu kolonii z krevního agaru resuspendovali ve 100 µl 5% chelexu. Po inkubaci a centrifugaci vzorků jsme získali supernatant obsahující izolovanou DNA.

4.2.2.2 Polymerázová řetězová reakce

Pro PCR za účelem amplifikace genu *nrdA* jsme použili směs forward a reverse primerů (1:1), *Aptamer Hot Start Master Mix* a PCR ultra čistou vodu. K roztoku jsme přidali DNA izolovanou buď chelexem nebo soupravou (*MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification Kit*). Směs se vzorkem jsme nechali amplifikovat v termocykleru (*Veriti™ 96-Well Thermal Cycler*, Applied Biosystems™). Celkový objem směsi reakce byl 25 µl. Složení přidávaných látek do reakce a její podmínky znázorňují následující tabulky 9 a 10.

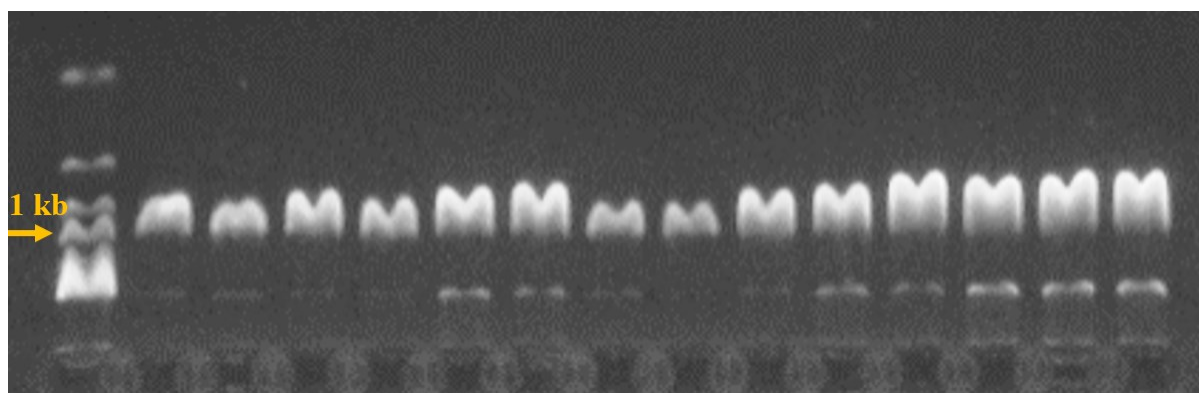
Tabulka 9. Složení přidávaných látek pro PCR reakci.

Složka	Objem [µl]
PCR voda	10,0 µl
Aptamer Hot Start Master Mix	12,5 µl
směs forward a reverse primerů 1:1	1,0 µl
DNA	1,5 µl

Tabulka 10. Podmínky PCR reakce pro amplifikaci genu *nrdA*.

	Teplota	Čas trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94 °C	1 minuta	1
Denaturace	94 °C	15 sekund	30
Nasednutí primerů	56 °C	30 sekund	
Extenze	72 °C	1 minuta	
Finální extenze	72 °C	7 minut	1

Přítomnost amplikonu o délce 954 bp (Spilker *et al.* 2012) jsme si ověřili gelovou elektroforézou (obrázek 3). Byl použit 2% agarózový gel obsahující agarózu, TBE pufr a fluorescenční barvivo *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10 000X in Water*. Do první jamky byl napipetován marker SM (1kb), které je součástí soupravy *UMD-SelectNA™* (Molzym GmbH & Co. KG). Po dokončení elektroforézy byl gel nasnímán pod UV zářením v transluminátoru systémem Vision-Capt (Vilber Lourmat).



Obrázek 3. Ověření přítomnosti amplikonu pomocí gelové elektroforézy.

4.2.2.3 Sekvence genu *nrdA*

Sekvenování genu *nrdA* bylo provedeno Sangerovou metodou. Nejprve byl PCR produkt přečištěn soupravou založenou na magnetických kuličkách *Agencourt® AMPure XP* od zbytků nukleotidů, primerů, polymerázy a solí. K PCR směsi s amplikonem jsme přidali homogenizovanou suspenzi kuliček a směs důkladně promíchali. Po inkubaci za účelem navázání DNA na kuličky jsme umístili mikrozkušavku se vzorkem do magnetického stojánku. Z mikrozkušavky jsme odstranili supernatant a kuličky dvakrát opláchli 75% ethanolem. Po odstranění ethanolu jsme mikrozkušavku vyjmuli z magnetického stojánku. Nechali jsme odpařit zbytkový ethanol při pokojové teplotě a následně magnetické kuličky resuspendovali v injekční vodě. Podrobný pracovní postup je uváděn výrobcem soupravy.

Sangerovo sekvenování bylo realizováno soupravou *BigDye® Direct Sanger Sequencing Kit*. Využívá elongaci primerů pomocí deoxyribonukleotidů následovanou terminací fluorescenčně značenými dideoxyribonukleotidy. Do dvou jamek mikrotitrační destičky jsme napipetovali předem připravený roztok obsahující *BigDye Terminator (BDT v3.1)*, sekvenační pufr s deoxyribonukleotidy (*5x sequencing buffer*) a injekční vodu. Do jedné jamky jsme přidali forward primer, do druhé reverse primer. Následně jsme do obou jamek přidali přečištěný PCR produkt a v termocykleru (*Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems™*) nechali proběhnout sekvenační reakci podle podmínek uvedených v tabulce 11. Podrobný návod je uváděn výrobcem u příslušné soupravy.

Tabulka 11. Podmínky sekvenační reakce pro sekvenaci genu *nrda*.

	Teplota	Čas trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	96 °C	1 minuta	1
Denaturace	96 °C	10 sekund	25
Nasednutí primerů	55 °C	5 sekund	
Extenze	60 °C	4 minuty	
Finální extenze	72 °C	7 minut	1

Po sekvenační reakci následovalo přečištění amplifikované DNA od zbytkového množství primerů, polymerázy, terminátoru a solí, pomocí soupravy magnetických kuliček *Agencourt® CleanSEQ*. Ke vzorkům jsme přidali suspenzi *Agencourt® CleanSEQ* a 85% ethanol a důkladně promíchali pipetou, aby se DNA navázala na kuličky. Mikrotitrační destičku jsme vložili do magnetického stojánku a z jamek odstranili supernatant obsahující zbytkové reagensie ze sekvenační reakce. Vzorky jsme dvakrát opláchli 85% ethanolem a po důkladném odstranění ethanolu vyjmuli destičku z magnetického stojánku. Nechali jsme kuličky vyschnout při pokojové teplotě a následně vzorky resuspendovali v injekční vodě. Podrobný návod je uveden výrobcem u příslušné soupravy.

Následovala analýza vzniklých fragmentů s využitím kapilární elektroforézy na přístroji ABI 3130xl Genetic Analyzer. Během procesu se kratší fragmenty DNA pohybují k anodě rychleji než delší úseky a při průchodu detektorem je zaznamenáváno pořadí signálů ze čtyř různě značených dideoxyribonukleotidů.

Pomocí softwaru Pregap4 version 1.5 jsme sekvence genu *nrda* získané amplifikací z forward a reverse primerů spojili na základě kompatibility bazí do jedné sekvence. Pomocí dalšího softwaru GAP v4:10 jsme sekvenci zarovnali a exportovali do výsledné

podoby, kterou jsme porovnali s referenčními sekvencemi v databázi PubMLST a identifikovali druh *Achromobacter* spp. (Jolley et al. 2018, https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_achromobacter_seqdef).

4.2.2.4 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Izoláty jsme inokulovali na TSA agar (*tryptone soya* agar) a kultivovali při 37 °C do druhého dne. Druhý den jsme izoláty z TSA agaru inokulovali na nové plotny s TSA agarem a nechali kultivovat 30 hodin při teplotě 37 °C. Následující den jsme v mikrozkuvkách s kovovými válečky (*Bruker Suspension Vial*, součást soupravy *IR Biotyper Kit*) resuspendovali biomasu odebranou z TSA plotny v 70% ethanolu, abychom usmrtili bakterie a zabránili dalším metabolickým reakcím. Pro zvýšení povrchového napětí suspenze jsme ke vzorkům přidali injekční vodu a vzorky důkladně homogenizovali. Suspenze buněk jsme napipetovali po 15 µl na jednotlivé terčíky destičky, nechali uschnout a následně analyzovali pomocí přístroje IR Biotyper (Bruker Daltonik GmbH). Pokus byl proveden ve dvou biologických replikátech, přičemž každý z nich zahrnoval čtyři technické replikáty. Podrobný popis je uveden v uživatelském manuálu pro IR Biotyper.

4.2.2.5 Celogenomová sekvenace

Celogenomové sekvenování bylo provedeno metodou Illumina sekvenování. DNA izolovanou pomocí soupravy *MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification Kit* jsme analyzovali změřením koncentrace na přístroji Qubit™ 4 Fluorometer pomocí soupravy *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit* a ověřením čistoty na přístroji NanoDrop™ Lite Spectrophotometer. Hodnoty koncentrace i čistota DNA byly dostačující pro další analýzu. Izolovanou DNA jsme naředili na výslednou koncentraci 0,2–0,5 ng/µl.

K přípravě knihovny fragmentů DNA jsme použili soupravu *Nextera XT DNA Library Preparation Kit*. Izolovanou DNA jsme fragmentovali a pomocí amplicon značící směsi (*Amplicon Tagment Mix*) a DNA značícího pufru (*Tagment DNA Buffer*) jsme v termocykleru na oba konce fragmentů napojili adaptéry. Ke vzorkům jsme přidali neutralizační značící pufr (*Neutralize Tagment Buffer*). Značení fragmentů DNA s navázanými adaptéry probíhalo v termocykleru pomocí dvojkombinací indexů pro primery s využitím *Nextera PCR Master Mix*. PCR produkt jsme si přečistili pomocí magnetických kuliček *Agencourt® AMPure XP* a po navázání DNA na kuličky jsme mikrozkuvku vložili do magnetického stojánku, odstranili supernatant a vzorek dvakrát promyli 80% ethanolem. Po důkladném odstranění ethanolu jsme mimo magnetický stojánek promíchali kuličky s resuspendačním pufrem

(*Resuspension Buffer*), abychom uvolnili DNA do pufru. Mikrozkuhavku jsme opět vložili do magnetického stojánku a izolovali roztok s přečištěnými fragmenty DNA. Koncentraci DNA jsme si ověřili na přístrojích Qubit™ 4 Fluorometer a Agilent Technology 2100 Bioanalyzer s použitím soupravy *High-Sensitivity DNA Library Preparation Kit*. Poté byly připravené knihovny DNA zaslány do laboratoře Novogene (zprostředkováno přes BIOGEN Praha s.r.o.), kde bylo provedeno celogenomové sekvenování metodou Illumina. Výsledná data jsme obdrželi v podobě krátkých čtení ve formátech souborů FASTA a FASTQ, která jsme dále zpracovávali bioinformatickými metodami.

Data ve formátu FASTA jsme analyzovali v databázi PubMLST a numerická označení alel pro geny *nusA*, *rpoB*, *eno*, *gltB*, *lepA*, *nuoL* a *nrdA* jsme porovnali se známými ST typy (Jolley *et al.* 2018, https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_achromobacter_seqdef).

4.2.3 Screening citlivosti vůči antibiotikům v průběhu chronické infekce

Antibiotická citlivost byla testována pomocí diskové difuzní metody na MH agaru, dle doporučení EUCAST (2022). Diskový difuzní test je pouze kvalitativní metodou používanou pro screening antibiotické citlivosti, nejedná se o kvantitativní metodu. Test byl proveden pro časosběrné izoláty od šesti pacientů (č. 1–6) pro zjištění, zda v průběhu chronické infekce při současné expozici antibiotikům dochází *in vivo* k adaptaci *Achromobacter* spp. na účinky antibiotik. Následně byla naše data doplněna o veškeré výsledky antibiotické citlivosti zaznamenané v laboratorním informačním systému (MicLab) pro *Achromobacter* spp. a *Alcaligenes* spp. u devíti vybraných pacientů.

Z čisté bakteriální kultury předem narostlé na MH agaru se s fyziologickým roztokem připravila bakteriální suspenze o zákalu 0,5 McFarland. Suspenze se nanasla na MH agar pomocí sterilních vatových tamponů a rovnoměrně rozetřela po plotně ve třech směrech. Na takto připravené plotny byly položeny antibiotické disky obsahující jednotlivá antibiotika (ampicilin-sulbaktam 10-10 µg, kotrimoxazol 25 µg, kolistin 10 µg, gentamicin 10 µg, tobramycin 10 µg, piperacilin-tazobaktam 30-6 µg, ceftazidim 10 µg, amikacin 30 µg, ciprofloxacin 5 µg, levofloxacin 5 µg, cefepim 30 µg, cefoperazon-sulbaktam 75-30 µg, imipenem 10 µg, meropenem 10 µg, tigecyklin 15 µg, ceftolozan-tazobaktam 30-10 µg a ceftazidim-avibaktam 10-4 µg). Plotny jsme nechali inkubovat 24 h při teplotě 37 °C. V místech, kam do agaru difunduje účinné antibiotikum v dostatečné koncentraci, bakterie neroste a dojde k vytvoření inhibičních zón uvnitř povrchu souvisle porostlého bakteriemi.

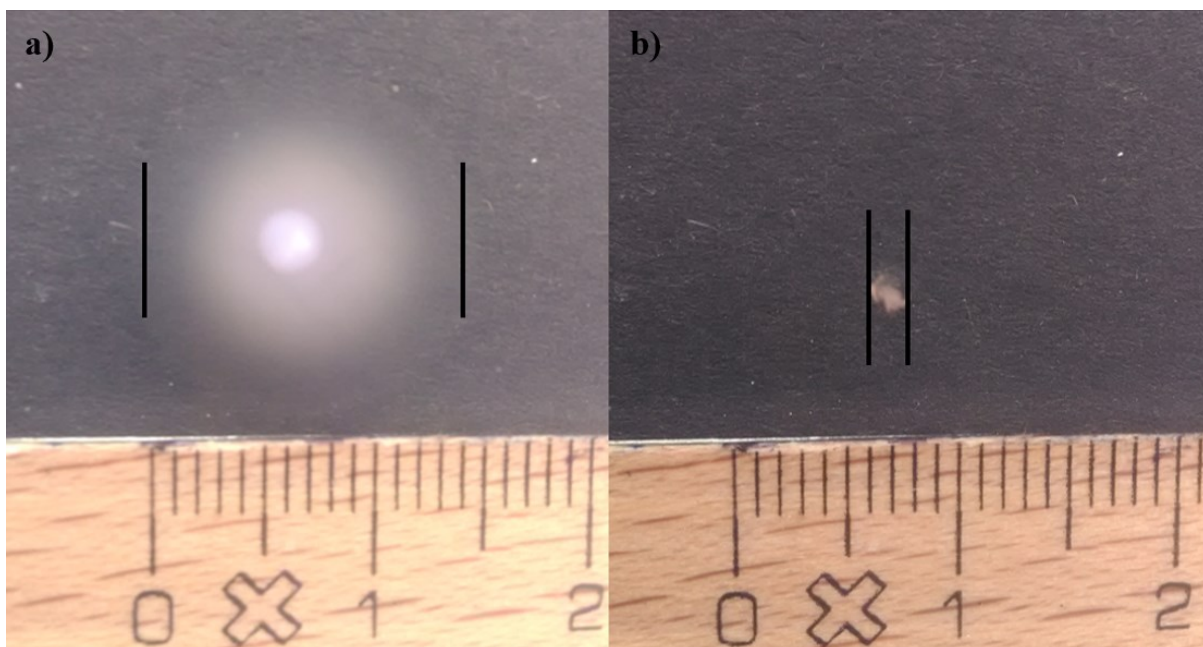
Druhý den jsme změřili průměr inhibičních zón včetně průměru antibiotického disku (6 mm) a vyhodnotili podle dostupných klinických breakpointů (viz. Výsledky kapitola 5.2).

4.2.4 Stanovení swimming motility

Pro studium motility byly vybrány izoláty *A. xylosoxidans* od dvou pacientů (č. 1 a 2; n=4) a *A. insuavis* od jednoho pacienta (č. 3; n=2) s časovým odstupem odběrů přibližně 10 let a od dalších tří pacientů (č. 4–6) izoláty *A. xylosoxidans* (n=6) s odstupem sedmi měsíců až jednoho roku.

Swimming motilita byla studována na 0,3% agaru, metodou popsanou dříve (Jakobsen *et al.* 2013), kterou jsme modifikovali. K přípravě 0,3% agaru byl použit čistý bakteriologický agar pro laboratorní použití a BHI bujón (o koncentraci 37 g práškové směsi na 1 l destilované vody). Ještě tekutý agar byl napipetován po 20 ml do sterilních Petriho misek o průměru 90 mm.

Na sterilní drátek o průměru 0,5 mm určený pro výrobu bakteriologických klíčků (výrobce Kanthal Corporation) byla nabrána část bakteriální kolonie a vybrané izoláty se vpichem zanesli do středu připravených ploten. Po inokulaci 0,3% agaru zůstala většina z nabraného množství bakteriální biomasy přichycena na drátku, a tudíž bylo pokaždé použito přibližně stejné množství bakterií. Plotny byly umístěny na 24 h do termostatu s teplotou 37 °C, obráceny dnem (agarem) dolů, aby nedocházelo ke kondenzaci vody na povrchu agaru a následnému růstu bakterií v kondenzátu po celém povrchu agaru. Druhý den byla změřena ostře ohraničená zóna růstu vyznačující se opalescentním zákalem v agaru značícím přítomnost bakterií (obrázek 4). Tento pokus byl proveden v biologických triplikátech.



Obrázek 4. Stanovení swimming motility. Izoláty *A. insuavis* od pacienta č. 1, a) časný, b) pozdní po 10 letech. Na snímcích je patrná ztráta swimming motility.

4.2.5 Transmisní elektronová mikroskopie

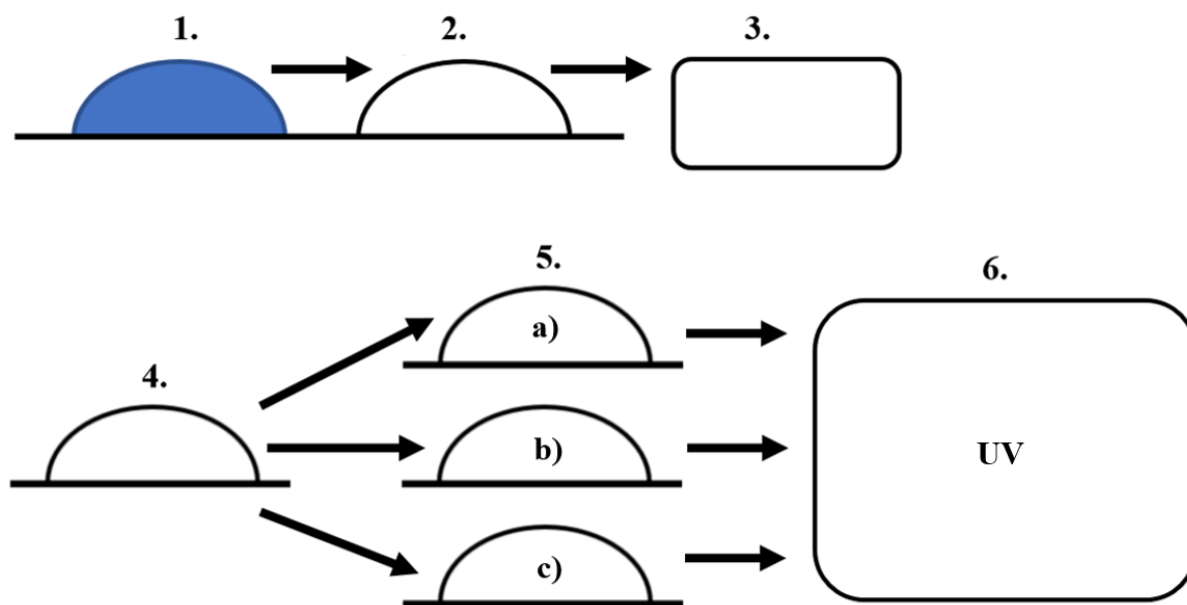
Časné a pozdní izoláty jednotlivých pacientů, které byly vybrány za účelem studia swimming motility, byly zpracovány a nasnímány metodou transmisní elektronové mikroskopie (TEM). TEM je metodou elektronové mikroskopie, která využívá detekce elektronů po průchodu skrz vzorek a umožňuje nám nahlédnout do vnitřní struktury vzorku.

Vzorky pro TEM jsme si připravili z ploten pro stanovení swimming motility, ze kterých jsme vyřízli opalescentní agarový bloček (o velikosti přibližně 3x3x3 mm) z okraje růstové zóny a vložili jej do mikrozkuřavky s 0,5 ml fyziologického roztoku. Tento fyziologický roztok obsahující bakterie z agaru byl následně použit jako analyzovaný materiál pro elektronovou mikroskopii.

4.2.5.1 Metoda negativního barvení

Měděná síťka pro elektronovou mikroskopii potažená formvarovou blánou (výrobce Ted Pella, Inc.) se hydratovala smáčením formvarové strany síťky v 1 % roztoku alciánové modři a kyseliny octové, opláchnutím ve čtyřech kapkách injekční vody a jemným osušením. Následně se položila na kapku fyziologického roztoku s bakteriemi a nechala 20 minut inkubovat. Poté se síťka přenesla na a) kapku 1% roztoku molybdenanu amonného, b) kapku 0,5% molybdenanu amonného nebo c) kapku 1% uranyl acetátu, vyjmula a ozářila UV zářením po dobu 20 minut. Schéma pro zpracování vzorku metodou negativního barvení je znázorněno

na obrázku 5. Snímky byly vyfoceny transmisním elektronovým mikroskopem HT7800 *Transmission Electron Microscope* od výrobce Hitachi a zpracovány softwarem dodávaným výrobcem společně s mikroskopem.



Obrázek 5. Schéma zpracování vzorku pro negativní barvení. 1. – smáčení v roztoku alcianové modři kyseliny octové; 2. – opláchnutí injekční vodou (4x); 3. – osušení; 4. – inkubace ve vzorku; 5. – negativní barvení a) 1% molybdenanem amonným, b) 0,5% molybdenanem amonným, c) 1% uranyl acetátem; 6. – UV záření.

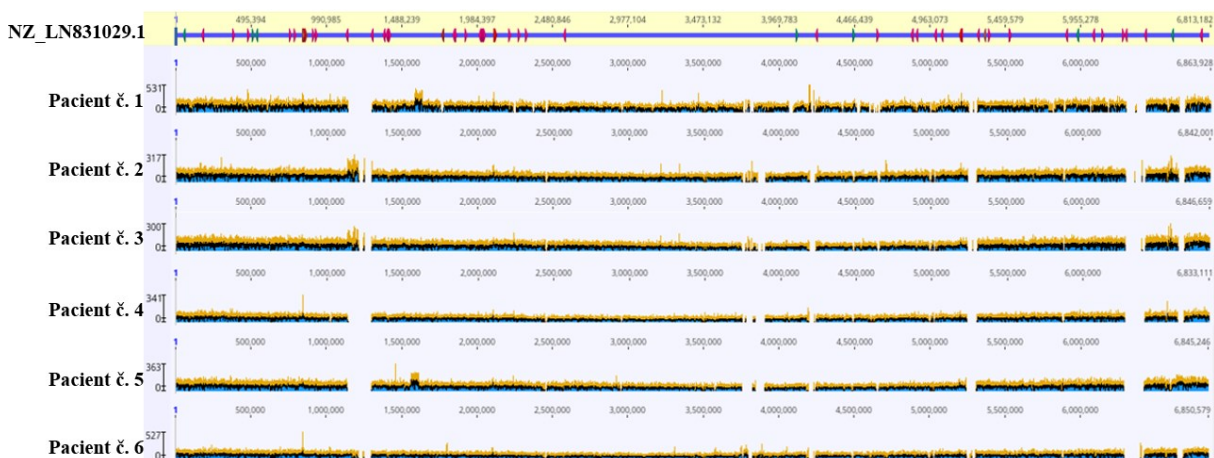
4.2.5.2 Metody pro zpracování agarového bločku

Abychom nahlédli i do středu agarového bločku a mohli pozorovat diverzitu různých motilních bakterií, pokusili jsme se zpracovat i samotný agarový bloček. Postupovali jsme podle laboratorního protokolu pro zpracování měkkých tkání. Vzorek se fixuje 5% glutaraldehydem po dobu 2 hodin a následně opláchne puřem složeným z kakodylanu sodného, kyseliny chlorovodíkové a injekční vody. Vzorek se obarví černě 1% oxidem osmičelým a dehydratuje vzestupnou řadou alkoholů (50%, 70% 95% a 100% ethanol), která probíhá až do druhého dne. Druhý den se vzorek infiltruje směsí absolutního ethanolu a pryskyřice (souprava *Spurr Low Viscosity Embedding Kit*) v poměrech 3:1, 1:1 a 1:3. Následuje infiltrace 100% pryskyřicí a třetí den se pryskyřice se vzorkem vloží do formy a nechá ztvrdnout v termostatu při teplotě 70 °C po dobu 8 hodin. Ze vzorku zalitého v pryskyřici se na ultramikrotomu (EM UC7, Leica) připraví ultratenké řezy, které se zachytí na síťku. Pro zvýšení kontrastu se řezy na síťce obarví uranyl acetátem a citrátem olovnatým a poté vizualizují v elektronovém mikroskopu. První zmíněná metoda, negativní barvení roztoku obsahujícího bakterie, však poskytovala lepší výsledky. Metody na zpracování

měkkých tkání se nám nepodařilo modifikovat tak, aby je bylo možné použít i pro zpracování agarového bločku. Použití této metody pro TEM by vyžadovalo optimalizaci, neboť agarový bloček byl v našem případě nestabilní a rozpouštěl se v použitých chemikáliích.

4.2.6 Bioinformatická analýza genetických změn pozdních izolátů

Do analýzy byla zahrnuta data z celogenomového sekvenování časných a pozdních izolátů od tří pacientů (č. 1–3) s časovým odstupem odběrů cca 10 let ($n=6$) a od tří pacientů (č. 4–6) s odstupem 7 až 12 měsíců ($n=6$). V databázi KmerFinder 3.2 (Hasman *et al.* 2014, <https://cge.food.dtu.dk/services/KmerFinder/>) jsme pomocí dat ve formátu FASTQ vyhledali geneticky nejvíce příbuzné zcela sekvenované kmene k našim časným izolátům. Pro všechny izoláty, *A. xylosoxidans* i *A. insuavis*, byla nalezena shodná referenční sekvence kmene *A. xylosoxidans* NCTC10807 (NZ_LN831029.1). Referenční sekvence byla stažena z databáze NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NZ_LN831029). Pomocí softwaru Geneious Prime (verze 2021.2.1) jsme provedli mapování krátkých čtení časných izolátů na referenční kmen (obrázek 6). Byly získány genomy o velikosti 6,0–6,2 Mbp pro izoláty *A. xylosoxidans* a 5,7 Mbp pro izolát *A. insuavis*. Genomy časných izolátů jsme anotovali pomocí nástroje RAST (Aziz *et al.* 2008, <https://rast.nmpdr.org/>). Pomocí nástroje snippy verze 4.6.0 (Seemann 2015, <https://github.com/tseemann/snippy>) dostupné na webovém rozhraní Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) jsme porovnali časosběrné izoláty. Časné izoláty jsme nyní použili jako referenční genomy, ke kterým jsme hledali nukleotidové záměny v datových souborech formátu FASTQ pozdních izolátů.



Obrázek 6. Mapování časných izolátů na příbuznou referenční sekvenci NZ_LN831029.1 v programu Geneious Prime, verze 2021.2.1. V referenční sekvenci nebyly nalezeny homologie ke všem krátkým čtením referenčního genomu (přerušené sekvence na obrázku) a stejně tak nebyla nalezena podobnost všech krátkých čtení s referenční sekvencí. Z tohoto důvodu nebylo možné následně porovnat veškeré geny z genomu. Většina krátkých čtení však byla namapována.

5 VÝSLEDKY

5.1 Identifikace a typizace *Achromobacter* spp.

Cíl: Identifikovat rod Achromobacter pro další analýzy několika metodami.

Prvním krokem v charakterizaci studovaných izolátů bylo identifikovat mezi izoláty rod *Achromobacter*, následnou druhovou identifikací odhadnout prevalenci druhů u pacientů s CF navštěvujících Centrum CF při FN Motol a porovnat spolehlivost následujících metod k tomu používaných v klinické praxi. Dále za účelem studia epidemiologie jsme analyzovali klonální strukturu izolátů pomocí FTIR-spektroskopie a metodou MLST pomocí dat celogenomového sekvenování.

5.1.1 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Všechny typové kmeny byly hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF správně zařazeny do rodu *Achromobacter*, jak znázorňuje tabulka 12. Pro pravděpodobné určení rodu musí nejlepší a druhá nejlepší shoda patřit ke stejnému rodu, a navíc nejlepší shoda musí vykazovat skóre alespoň 1,70. Pro identifikaci rodu s vysokou pravděpodobností správného výsledku je spodní hranice skóre posunuta na 2,00. Pravděpodobná identifikace druhu je možné pouze v případě, že obě shody náleží ke stejnému druhu a nejlepší shoda je s hodnotou skóre ≥ 2 . Přestože kmen *A. ruhlandii* vykazoval skóre nejlepší shody vyšší než 2, byl označen za *A. xylosoxidans*. Pokud shody patří ke stejnému druhu, a navíc je hodnota skóre $\geq 2,3$, je bakteriální druh identifikován s vysokou pravděpodobností. Toto kritérium bylo splněno pouze pro *A. xylosoxidans*.

Tabulka 12. Identifikace typových kmenů *Achromobacter* spp. pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Zeleně je znázorněná identifikace druhu s vysokou pravděpodobností, žlutě vysoce pravděpodobná identifikace rodu s pravděpodobnou identifikací druhu, oranžově pravděpodobná identifikace rodu.

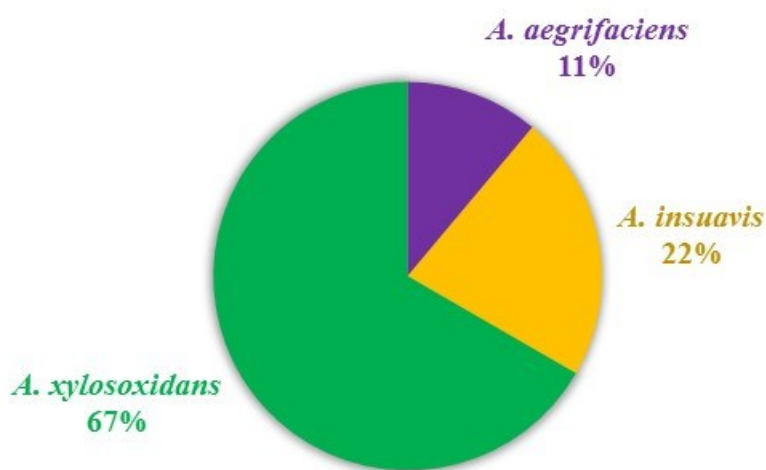
Kmen	Druh	Pravděpodobný organismus			
		Nejlepší shoda	Skóre	Druhá nejlepší shoda	Skóre
CCM 2741 ^T	<i>A. xylosoxidans</i>	<i>A. xylosoxidans</i>	2,37	<i>A. xylosoxidans</i>	2,30
CCM 2986 ^T	<i>A. piechaudii</i>	<i>A. piechaudii</i>	1,95	<i>A. spanius</i>	1,90
CCM 3427 ^T	<i>A. denitrificans</i>	<i>A. denitrificans</i>	2,24	<i>A. denitrificans</i>	1,99
CCM 7182 ^T	<i>A. insolitus</i>	<i>A. insolitus</i>	2,14	<i>A. insolitus</i>	1,97
CCM 7183 ^T	<i>A. spanius</i>	<i>A. spanius</i>	2,01	<i>A. piechaudii</i>	1,75
CCM 7494 ^T	<i>A. ruhlandii</i>	<i>A. xylosoxidans</i>	2,04	<i>A. ruhlandii</i>	2,03
CCM 7608 ^T	<i>A. marplatensis</i>	<i>Achromobacter</i> sp.	1,83	<i>A. mucicolens</i>	1,78

Všech 24 studovaných klinických izolátů bylo systémem MALDI-TOF správně zařazeno do rodu *Achromobacter*. Spolehlivost identifikace druhů z klinického materiálu nemůžeme pomocí hmotnostní spektrometrie posoudit z důvodů nízké variability druhů a převážného zastoupení *A. xylosoxidans* ve sledovaném souboru. Účelem této metody však bylo pouze identifikovat izoláty *Achromobacter* spp. pro další analýzy, čehož bylo dosaženo.

5.1.2 Sekvence genu *nrda*

Druhá identifikace byla provedena sekvenací genu *nrda* a následným porovnáním fragmentu o délce 765 bp v databázi PubMLST *Achromobacter* typing database (Jolley *et al.* 2018, https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_achromobacter_seqdef). Zjistili jsme, že u pacientů s CF navštěvujících Centrum CF při FN Motol (n=9) je dominantním druhem *A. xylosoxidans* v 67 % případů (n=6), následovaný *A. insuavis* ve 22 % případů (n=2) a *A. aegrifaciens* tvořící 11 % případů (n=1). Zastoupení druhů *Achromobacter* spp. u devíti sledovaných pacientů navštěvujících Centrum CF při FN Motol je znázorněno na obrázku 7.

Prevalence druhů *Achromobacter* spp.

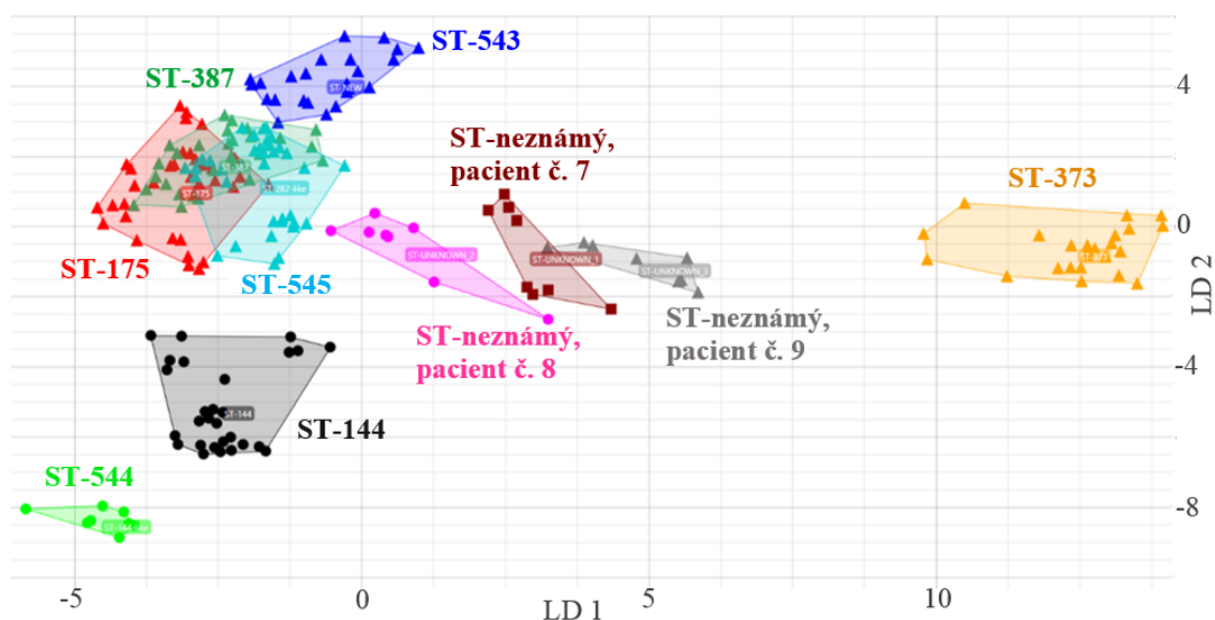


Obrázek 7. Prevalence druhů *Achromobacter* spp. u devíti sledovaných pacientů Centra CF při FN Motol.

5.1.3 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Na obrázku 8 je znázorněno grafické vyobrazení infračervených spekter izolátů v bodech, kde každý bod představuje jedno měření jednoho izolátu. Graf je vytvořen pomocí parametrů LD 1 a LD 2. Lineární diskriminační analýza (LDA) je metoda redukcí informace PCA (*Principal Component Analysis*, analýza hlavních komponent) na základě údajů o zařazení

do námi definovaných skupin (tzv. hledá vzorce, podle kterých může body zařadit do daných skupin a jednotlivé skupiny oddělit od sebe). PCA redukuje vstupní informace do menšího množství dimenzí. Při LDA metodě byly v našem případě skupiny tvořeny podle ST typů, které byly k izolátům přiřazeny až dodatečně v průběhu jejího vyhodnocování. Obrázek 8 naznačuje, že jednotlivé sekvenční (ST) typy mohou tvořit skupiny, ale zároveň se tyto skupiny překrývají. Metodou FTIR se nám nepodařilo ani odlišit od sebe druhy *Achromobacter* spp.



Obrázek 8. Grafické znázornění infračervených spekter jednotlivých ST typů v bodech podle parametrů LD 1 a LD 2. Barevně jsou odlišeny ST typy, tvary značí druhy *Achromobacter* spp.: ▲ pro *A. xylosoxidans*, ● pro *A. insuavis*, ■ pro *A. aegrifaciens*. ST typy odpovídají jednotlivým pacientům, pouze ST-544 (světle zelený) vznikl u pacientovi z ST-144 (černý) jednou synonymní nukleotidovou záměnou v genu *eno*.

5.1.4 Multilokusová sekvenční typizace (MLST)

Při sestavování profilu MLST jsme zjistili, že každý pacient má *Achromobacter* spp. s odlišným ST typem. Identifikovali jsme tři nové ST typy. ST-543 obsahoval již anotované alely, ale v doposud nezaznamenané kombinaci. ST-544 se vyvinul z ST-144 jednou synonymní nukleotidovou záměnou v genu *eno* a ST-545 vznikl z původního ST-282 jednou synonymní nukleotidovou záměnou v genu *nusA*. Zároveň jsme zjistili, že jednotliví pacienti byli v průběhu chronické infekce infikováni stále stejným ST typem, přestože infekce u některých pacientů (č. 1–3) trvala i 10 let. Výjimku tvořil chronologicky třetí ze studovaných izolátů (1.3, viz. tabulka 13) od pacienta č. 1. Nicméně jako ST-544 (vzniklý původně z ST-144) byl identifikován jen tento izolát a při následném odběru byl zaznamenán opět původní ST-144. Výsledky MLST typizace jsou znázorněny v tabulce 13.

Tabulka 13. MLST a utčení ST typu u časosběrných izolátů *Achromobacter* spp. U pacientů č. 1–3 byl časový odstup mezi prvním a posledním izolátem cca 10 let, u pacientů č. 4–6 byl tento interval 7 až 12 měsíců.

Pacient č.	Izolát	Druh (<i>nrda_76S</i>)	ST typ	<i>nusA</i>	<i>rpoB</i>	<i>eno</i>	<i>gltB</i>	<i>lepA</i>	<i>nuoL</i>	<i>nrda</i>
1	1.1	<i>A. insuavis</i>	144	26	47	13	10	53	14	71
	1.2	<i>A. insuavis</i>	144	26	47	13	10	53	14	71
	1.3	<i>A. insuavis</i>	544	26	47	146	10	53	14	71
	1.4	<i>A. insuavis</i>	144	26	47	13	10	53	14	71
2	2.1	<i>A. xylosoxidans</i>	175	1	26	2	2	86	4	2
	2.2	<i>A. xylosoxidans</i>	175	1	26	2	2	86	4	2
	2.3	<i>A. xylosoxidans</i>	175	1	26	2	2	86	4	2
	2.4	<i>A. xylosoxidans</i>	175	1	26	2	2	86	4	2
3	3.1	<i>A. xylosoxidans</i>	545	185	21	2	4	59	9	3
	3.2	<i>A. xylosoxidans</i>	545	185	21	2	4	59	9	3
	3.3	<i>A. xylosoxidans</i>	545	185	21	2	4	59	9	3
	3.4	<i>A. xylosoxidans</i>	545	185	21	2	4	59	9	3
4	4.1	<i>A. xylosoxidans</i>	543	85	26	2	2	59	8	2
	4.2	<i>A. xylosoxidans</i>	543	85	26	2	2	59	8	2
	4.3	<i>A. xylosoxidans</i>	543	85	26	2	2	59	8	2
5	5.1	<i>A. xylosoxidans</i>	387	1	26	8	2	59	8	2
	5.2	<i>A. xylosoxidans</i>	387	1	26	8	2	59	8	2
	5.3	<i>A. xylosoxidans</i>	387	1	26	8	2	59	8	2
6	6.1	<i>A. xylosoxidans</i>	373	2	107	2	2	59	89	2
	6.2	<i>A. xylosoxidans</i>	373	2	107	2	2	59	89	2
	6.3	<i>A. xylosoxidans</i>	373	2	107	2	2	59	89	2

5.2 Screening citlivosti vůči antibiotikům v průběhu chronické infekce

Cíl: Sledovat vývoj rezistencí Achromobacter spp. vůči vybraným antibiotikům v průběhu chronické infekce.

Hodnocení výsledků diskových difuzních testů probíhalo dle doporučení (EUCAST 2022) společně se záznamy o citlivosti *Achromobacter* spp. a *Alcaligenes* spp. od pacientů č. 1–6.

Záznamy z laboratorního systému, které vykazovaly posun velikosti inhibičních zón u všech testovaných antibiotik jedním směrem, nebyly zahrnuty do analýzy z důvodu možného použití inokula o vyšší či nižší denzitě. Zároveň jsme z vyhodnocení výsledků vyjmuli data, u kterých jsme je domnívali, že došlo k chybnému zaznamenání hodnoty – podle doporučení (EUCAST 2022) pro hodnocení diskového difuzního testu se za inhibiční zónu kolem disku kotrimoxazolu považuje oblast i s pouhým náznakem inhibice, přestože v ní dochází k růstu bakterií. Z toho důvodu nebyly do analýzy zahrnuty inhibiční zóny kotrimoxazolu o velikosti 6 mm, které se střídali s hodnotami odpovídajícími citlivosti achromobakterů vůči kotrimoxazolu. Kritéria pro kvalitativní určení citlivosti či rezistence jsou uvedeny v tabulce 14 podle dostupných klinických breakpointů, včetně obsahu (μg) použitého disku. Pokud nebyly dostupné klinické breakpointy pro *A. xylosoxidans*, byly převzaty hodnoty pro *P. aeruginosa* či *Pseudomonas* spp. dle doporučení (Filipic *et al.* 2017).

Tabulka 14. Klinické breakpointy použité v této práci pro hodnocení antibiotické citlivosti. Pokud byla inhibiční zóna větší nebo rovna klinickému breakpointu, byl izolát považován za citlivý vůči danému antibiotiku, v opačném případě byl vyhodnocen jako rezistentní. Pokud velikost inhibiční zóny náležela intervalu stanovenému pro breakpoint, byl izolát označen za intermediálně rezistentní. V případech, kdy klinické breakpointy nebyly známé, jsme hodnotili pouze změnu velikosti inhibiční zóny mezi longitudinálními výsledky testů.

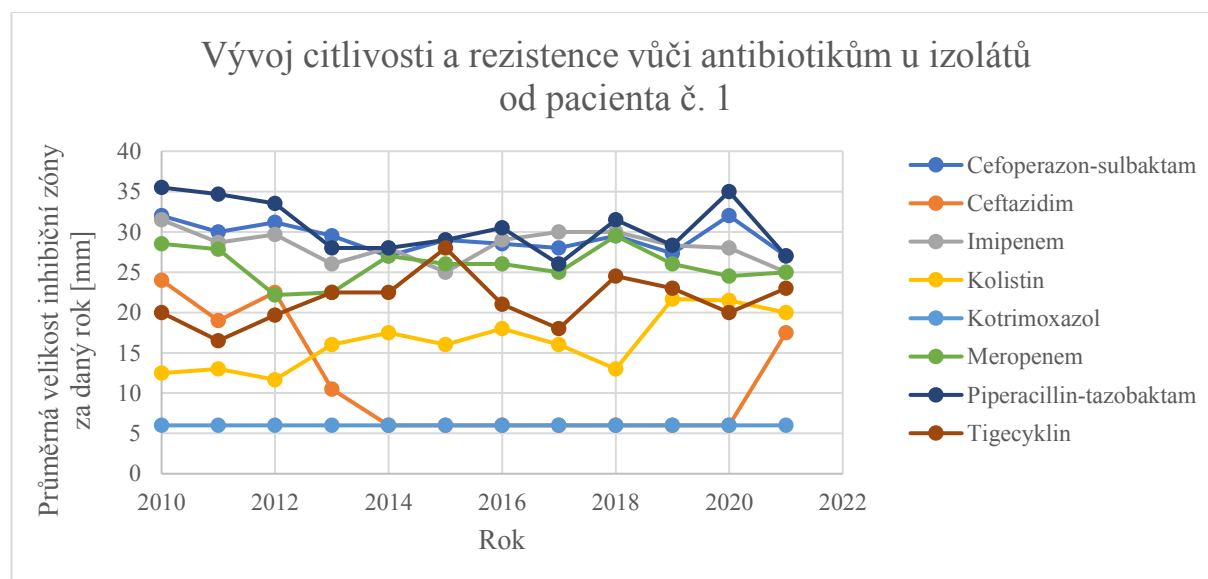
Antibiotikum	Obsah disku [µg] (antibiotikum-inhibitor)	Klinický breakpoint	Breakpoint pro:	Reference
Amikacin	30	15	<i>Pseudomonas spp.</i>	EUCAST 2022
Ampicilin-sulbaktam	10-10	neznámý	-	-
Cefepim	30	21	<i>Pseudomonas spp.</i>	EUCAST 2022
Cefoperazon-sulbaktam	75-30	neznámý	-	-
Ceftazidim	10	17	<i>Pseudomonas spp.</i>	EUCAST 2022
Ceftazidim-avibaktam	10-4	17	<i>Pseudomonas spp.</i>	EUCAST 2022
Ceftolozan-tazobaktam	30-10	23	<i>Pseudomonas spp.</i>	EUCAST 2022
Ciprofloxacin	5	26	<i>Pseudomonas spp.</i>	EUCAST 2022
Gentamicin	10	18	<i>Pseudomonas spp.</i>	BSAC 2013
Imipenem	10	20	<i>Pseudomonas spp.</i>	EUCAST 2022
Kolistin	10	11	<i>P. aeruginosa</i>	Galani <i>et al.</i> 2008
Kotrimoxazol	1,25-23,75	26	<i>A. xylosoxidans</i>	EUCAST 2022
Levofloxacin	5	18	<i>Pseudomonas spp.</i>	EUCAST 2022
Meropenem	10	20–26	<i>A. xylosoxidans</i>	EUCAST 2022
Netilmicin	10	14	<i>Pseudomonas spp.</i>	BSAC 2013
Ofloxacin	5	16–22	<i>P. aeruginosa</i>	Fuchs <i>et al.</i> 1989
Piperacilin-tazobaktam	30-6	26	<i>A. xylosoxidans</i>	EUCAST 2022
Tigecyklin	15	neznámý	-	-
Tobramycin	10	18	<i>Pseudomonas spp.</i>	EUCAST 2022

Následně byla z velikostí inhibičních zón vypočtena průměrná hodnota pro jednotlivé pacienty a antibiotika pro každý kalendářní rok, ze kterého izoláty pocházely. Tento průměr byl vypočten většinou ze tří až pěti odběrů za rok, avšak v některých letech byla citlivost testována pouze u jednoho či dvou izolátů. Průměrné hodnoty tvořené jedním izolátem byly zodpovědné za výraznější odchylky mezi údaji z přilehlých let.

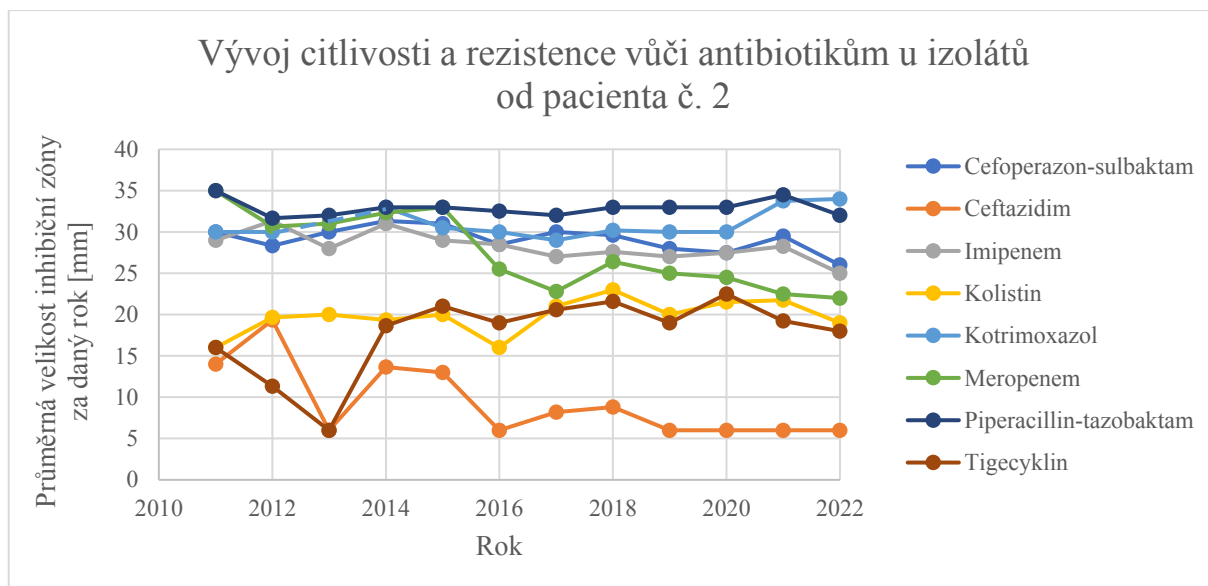
Izoláty *Achromobacter* spp. od všech šesti pacientů byly rezistentní vůči amikacinu, gentamicinu i tobramycinu. Izoláty od čtyř z těchto pacientů byly rezistentní i vůči netilmicinu, zbývající dva izoláty nebyly testovány na citlivost vůči tomuto antibiotiku. U izolátů od všech pacientů byla nejčastěji naměřená inhibiční zóna kolem disků ampicilin-sulbaktamu a ceftolozan-tazobaktamu rovna 6 mm, což odpovídá růstu bakterií až k antibiotickému disku. Většina izolátů byla rezistentní či intermediálně rezistentní vůči fluorochinolonům, mezi něž patří ciprofloxacin, ofloxacin a levofloxacin. Pouze izoláty *A. xylosoxidans* od jednoho

pacienta (č. 4) odebrané v průběhu roku 2021 vykazovaly citlivost vůči levofloxacinu, záznamy o citlivosti ani izoláty z jiných let jsme neměli k dispozici. U téměř všech izolátů jsme zaznamenali rezistenci vůči cefepimu. Výjimku tvořily odběry v prvním sledovaném roce u pacienta č. 5, kdy byla zaznamenána hodnota inhibiční zóny 21 mm, která je hraniční hodnotou pro interpretaci izolátu jako citlivý kmen. Informace o velikosti inhibičních zón ceftazidim-tazobaktamu jsme neměli k dispozici od všech pacientů, a navíc účinnost tohoto antibiotika byla testována jen v některých letech. Z důvodu nedostatku údajů nebyl ceftazidim-tazobaktam zařazen do následující podrobné analýzy vývoje rezistence v čase. Když jsme však porovnali velikosti inhibičních zón samostatného ceftazidimu a jeho kombinace s inhibitorem z dostupných údajů, velikosti inhibičních zón vykazovaly podobné hodnoty. Klinický breakpoint i obsah antibiotika v disku byly totožné.

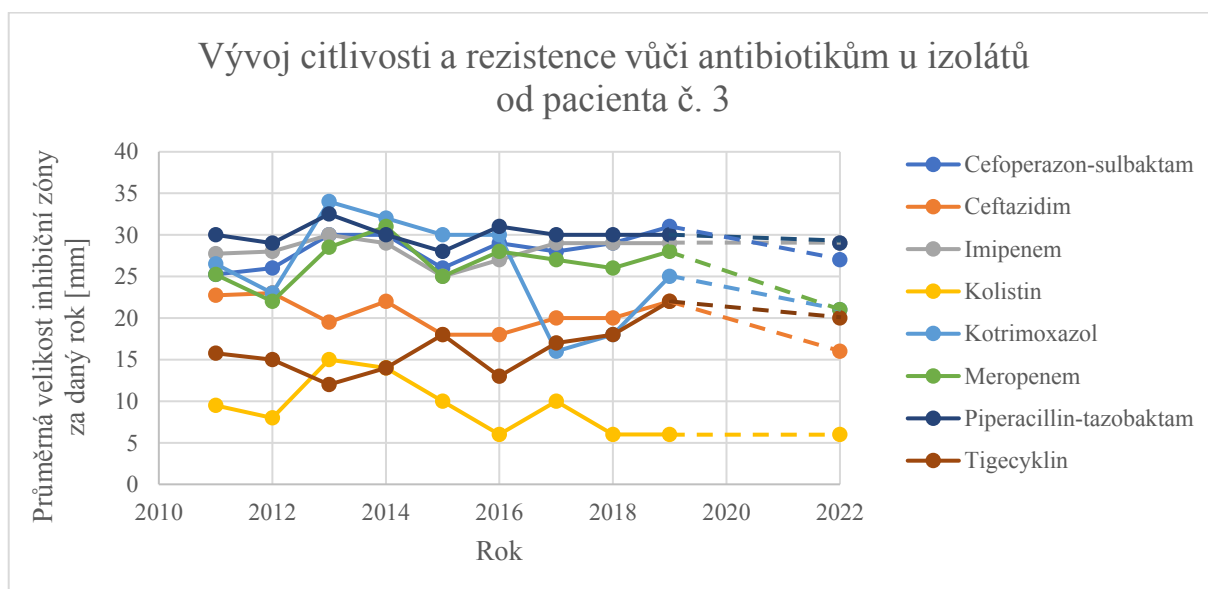
Podrobně byla sledována účinnost antibiotik, která se ukázala *in vitro* účinná proti vícero izolátům či s inhibiční zónou větší než 18 mm, pokud nebyly k dispozici klinické breakpointy. Mezi tato antibiotika jsme zařadili cefoperazon-sulbaktam, ceftazidim, imipenem, kolistin, kotrimoxazol, meropenem, piperacilin-tazobaktam, a tigecyklin. Změny velikosti inhibičních zón izolátů v čase pro jednotlivé pacienty jsou prezentovány na následujících obrázcích (obrázky 9–14).



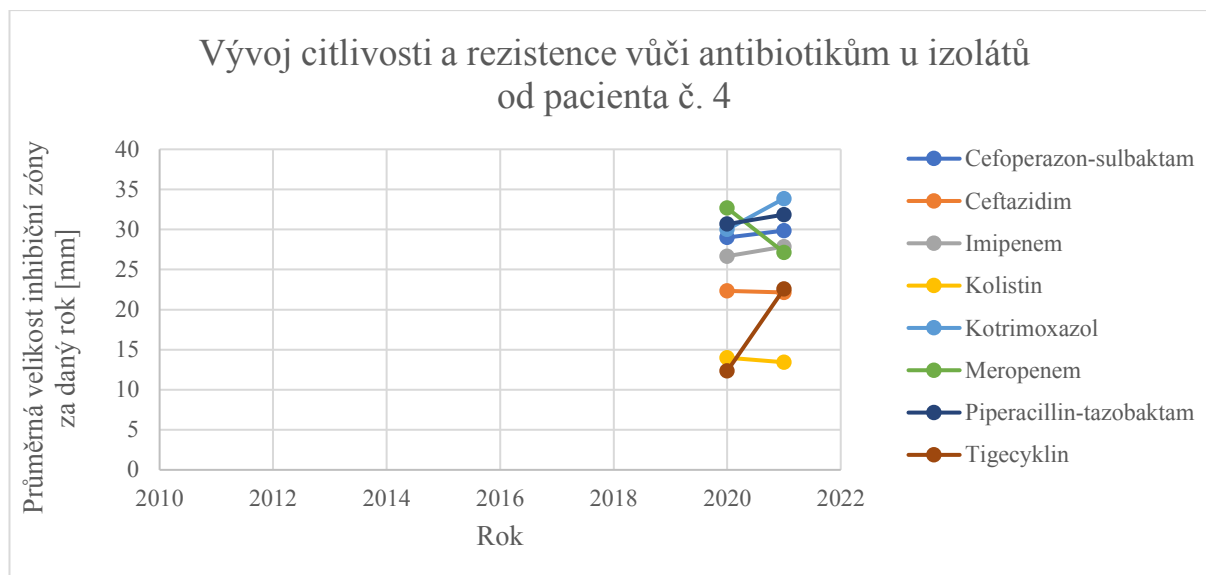
Obrázek 9. Vývoj citlivosti a rezistence vůči antibiotikům u izolátů *A. insuavis* od pacienta č. 1. První pozitivní kultivace *Alcaligenes* sp. z dýchacích cest pacienta byla zaznamenána v roce 2009, ze kterého nemáme údaje o citlivosti bakterie. Pacient byl sledován v Centru CF při FN Motol od roku 1997. Po celou dobu sledování chronické infekce byly izoláty citlivé k imipenemu, kolistinu a piperacilin-tazobaktamu. Mezi lety 2012 a 2013 došlo ke vzniku rezistence vůči ceftazidimu, obnova citlivosti byla zaznamenána až v roce 2021. K meropenemu byla většina izolátů citlivá, některé byly intermediálně rezistentní. Izoláty byly od samého počátku rezistentní vůči kotrimoxazolu. Cefoperazon-sulbaktam a tigecyklin vykazovaly poměrně velkou inhibiční zónu (27–32 mm pro cefoperazon-sulbaktam a 17–28 mm pro tigecyklin), nicméně pro tyto antibiotické disky nejsou známy klinické breakpointy.



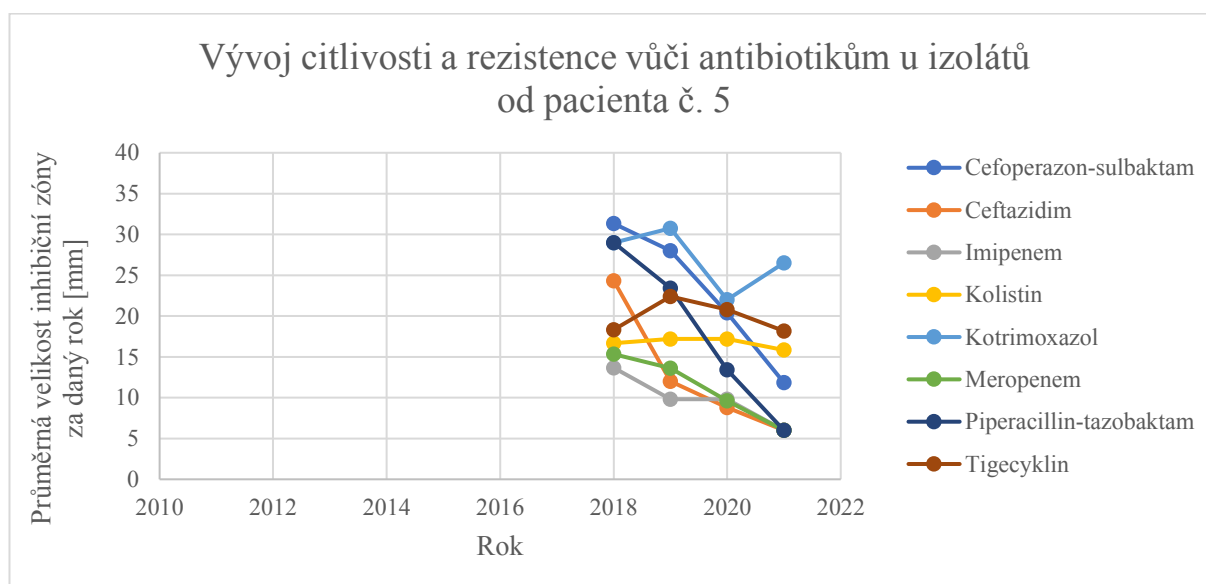
Obrázek 10. Vývoj citlivosti a rezistence vůči antibiotikům u izolátů *A. xylosoxidans* od pacienta č. 2. První pozitivní kultivace *A. xylosoxidans* z dýchacích cest pacienta byla zaznamenána v roce 2011 a tento první izolát byl archivován. Pacient byl sledován v Centru CF při FN Motol od roku 2002. Po celou dobu sledování infekce byly izoláty citlivé k imipenemu, kolistinu, kotrimoxazolu a piperacilin-tazobaktamu. V průběhu chronické infekce došlo ke změně v citlivosti vůči meropenemu, kdy se z citlivého kmene stal intermediálně rezistentní. Vůči ceftazidimu byly citlivé pouze izoláty z roku 2012, izoláty z dalších let byly rezistentní. Navíc vykazovaly trend snižování velikosti inhibiční zóny kolem disku ceftazidimu a od roku 2019 zůstaly na nejmenší možné hodnotě 6 mm. Kolem disku cefoperazon-sulbaktamu byla zaznamenána inhibiční zóna v rozmezí 26–31 mm, kolem tigecyklinu 6–23 mm. Pro poslední dvě zmíněná antibiotika nejsou známy klinické breakpointy.



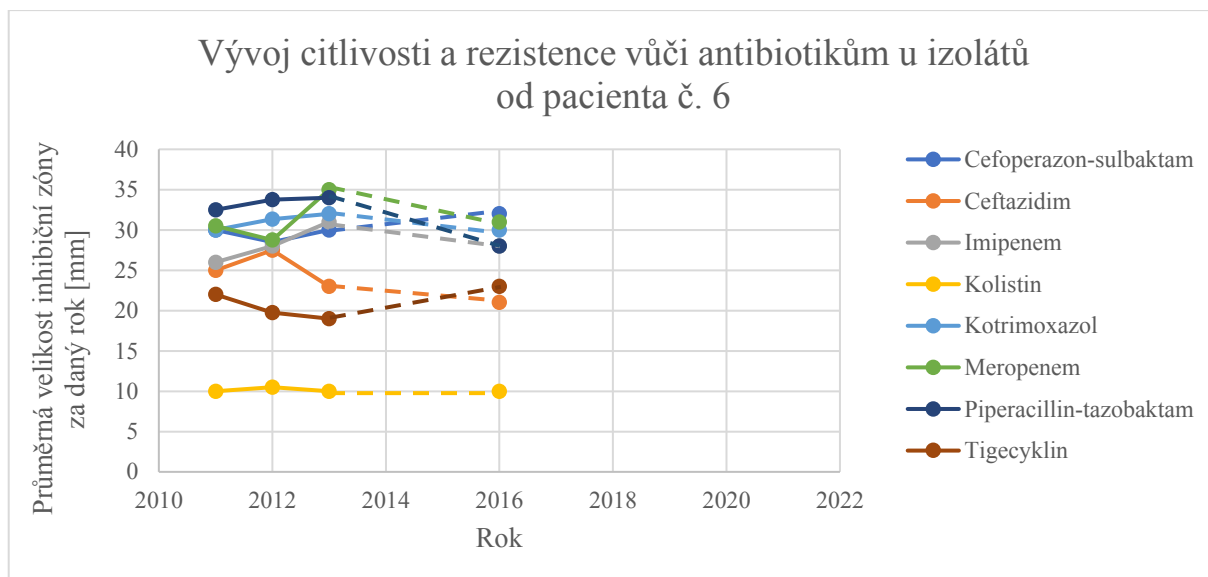
Obrázek 11. Vývoj citlivosti a rezistence vůči antibiotikům u izolátů *A. xylosoxidans* od pacienta č. 3. První pozitivní kultivace *Alcaligenes* sp. z respiračního traktu pacienta byla zaznamenána v roce 2011, ze kterého máme archivované izoláty ze dvou odběrů. Pacient byl sledován v Centru CF při FN Motol mezi lety 2011 až 2019. Následný izolát z roku 2022 byl získán z centra CF, které pacient navštěvuje v současnosti. Po celou dobu sledování chronické infekce byly izoláty citlivé k imipenemu a piperacilin-tazobaktamu. Izoláty byly citlivé nebo intermediálně rezistentní k meropenemu, přičemž nebyl zaznamenán žádný stálý trend vývoje rezistence. V průběhu chronické infekce došlo ke vzniku rezistence vůči ceftazidimu a kolistinu. Vůči kotrimoxazolu byly střídavě zaznamenávány citlivé a rezistentní izoláty. Velikosti inhibičních zón pro cefoperazon-sulbaktam byly v intervalu 25–31 mm a pro tigecyklin 12–22 mm.



Obrázek 12. Vývoj citlivosti a rezistence vůči antibiotikům u izolátů *A. xylosoxidans* od pacienta č. 4. První pozitivní kultivace *A. xylosoxidans* z dýchacích cest pacienta byla zaznamenána v roce 2020. Pacient byl sledován v Centru CF při FN Motol od roku 2002. Po dobu sledování infekce *A. xylosoxidans*, tedy mezi lety 2020 až 2021, byly izoláty citlivé k ceftazidimu, imipenemu, kolistinu, kotrimoxazolu, meropenemu a piperacilin-tazobaktamu, přestože došlo ke zmenšení inhibiční zóny meropenemu. Velikost inhibiční zóny cefoperazon-sulbaktamu se mírně zvětšila z 29 na 30 mm, u tigecyklinu bylo zaznamenáno výraznější zvětšení inhibiční zóny z 12 na 23 mm.

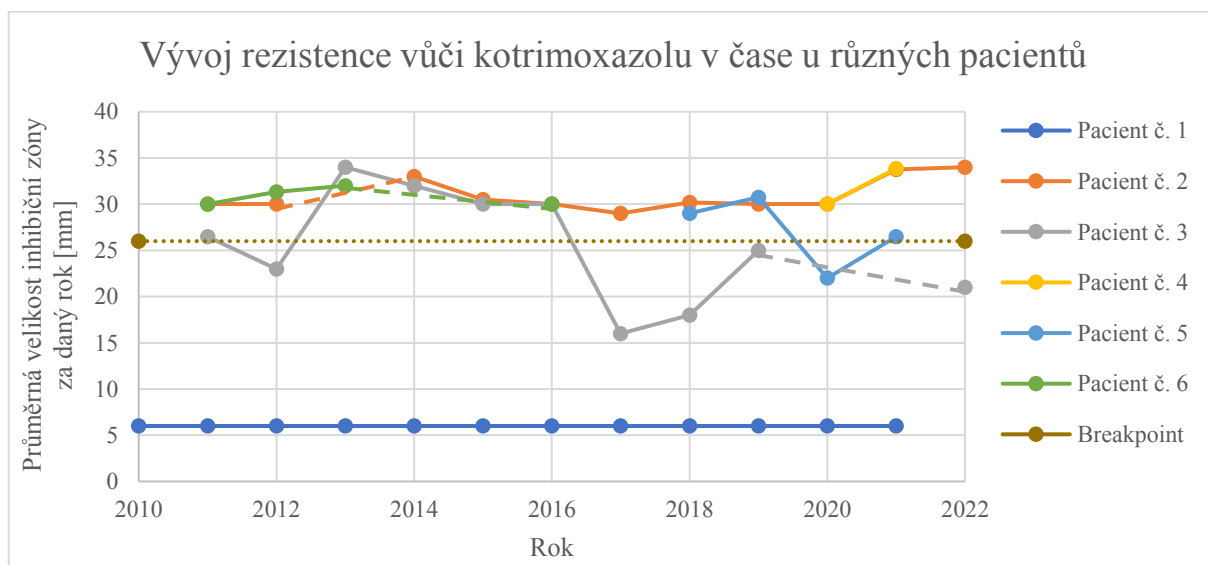


Obrázek 13. Vývoj citlivosti a rezistence vůči antibiotikům u izolátů *A. xylosoxidans* od pacienta č. 5. První pozitivní kultivace *Alcaligenes sp.* z dýchacích cest pacienta byla zaznamenána v roce 2010, druhý pozitivní odběr *Achromobacter sp.* následovat v roce 2015 a kritérium pro chronickou infekci definované alespoň třemi pozitivními odběry za rok (Barrado *et al.* 2013) bylo splněno až od roku 2018. Pacient byl sledován v Centru CF při FN Motol od roku 2006. Po celou dobu sledování chronické infekce byly izoláty citlivé pouze ke kolistinu. Došlo ke vzniku rezistence vůči ceftazidimu a piperacilin-tazobaktamu. Vůči kotrimoxazolu byly střídavě zaznamenávány citlivé a rezistentní izoláty. Izoláty byly od počátku rezistentní vůči imipenemu a meropenemu. Velikosti inhibičních zón pro cefoperazon-sulbaktam se významně snížily z 24 mm na 12 mm. Křivka znázorňující vývoj velikostí inhibičních zón cefoperazon-sulbaktamu se nápadně podobá křivce rozvoje rezistence vůči piperacilin-tazobaktamu. Hodnoty velikosti inhibičních zón tigecyklinu se pohybovaly mezi 18 až 22 mm.

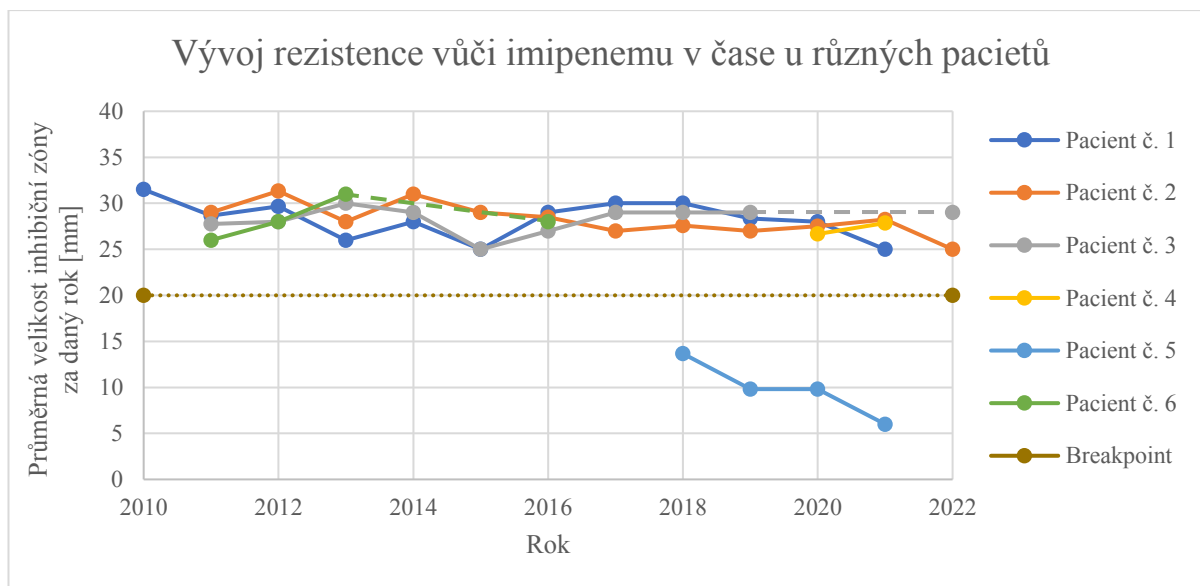


Obrázek 14. Vývoj citlivosti a rezistence vůči antibiotikům u izolátů *A. xylosoxidans* od pacienta č. 6. První pozitivní kultivace *Alcaligenes sp.* z dýchacích cest pacienta byla zaznamenána v roce 2005. Pacient byl sledován v Centru CF při FN Motol od roku 1999. Z období let 2014 a 2015 nemáme informace o pozitivních nálezech *Achromobacter spp.* Po celou dobu sledování chronické infekce byly izoláty citlivé k ceftazidimu, imipenemu, kotrimoxazolu, meropenemu a piperacilin-tazobaktamu. Většina izolátů byla rezistentní vůči kolistinu. Kolem disku cefoperazon-sulbaktamu byla zaznamenána inhibiční zóna v rozmezí 29–32 mm, kolem disku tigecyklinu 19–23 mm.

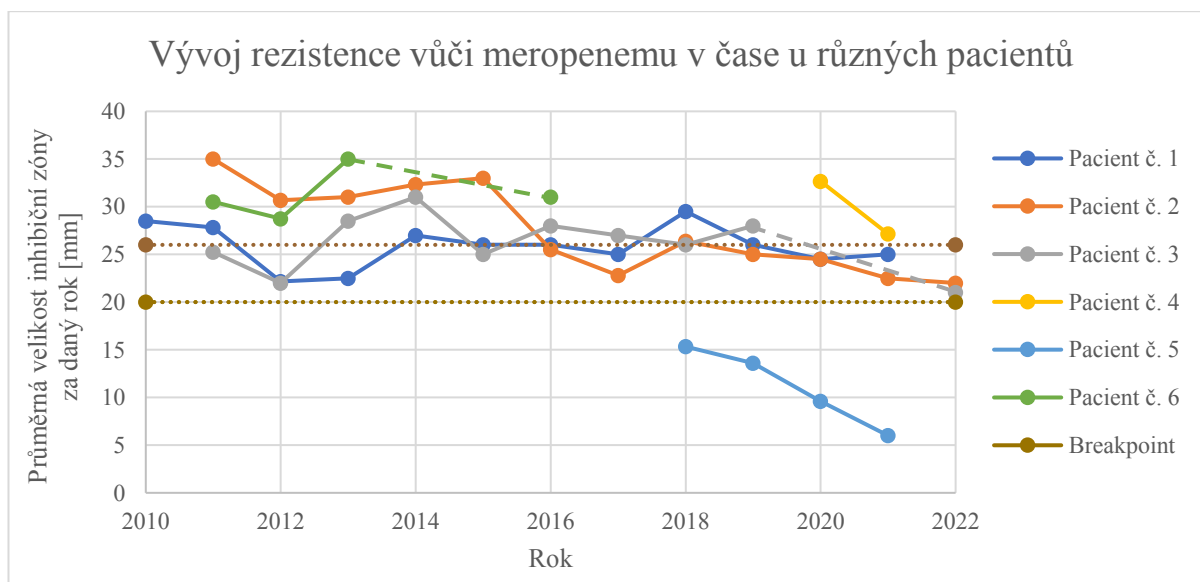
Změny v citlivostech jsme sledovali i z pohledu vývoje vzniku rezistence vůči jednotlivým antibiotikům (obrázky 15–18). Ke vzniku rezistence nedocházelo pouze v průběhu chronické infekce. Zaznamenali jsme rezistence některých izolátů vůči kotrimoxazolu a karbapenemům již v počátku chronické infekce.



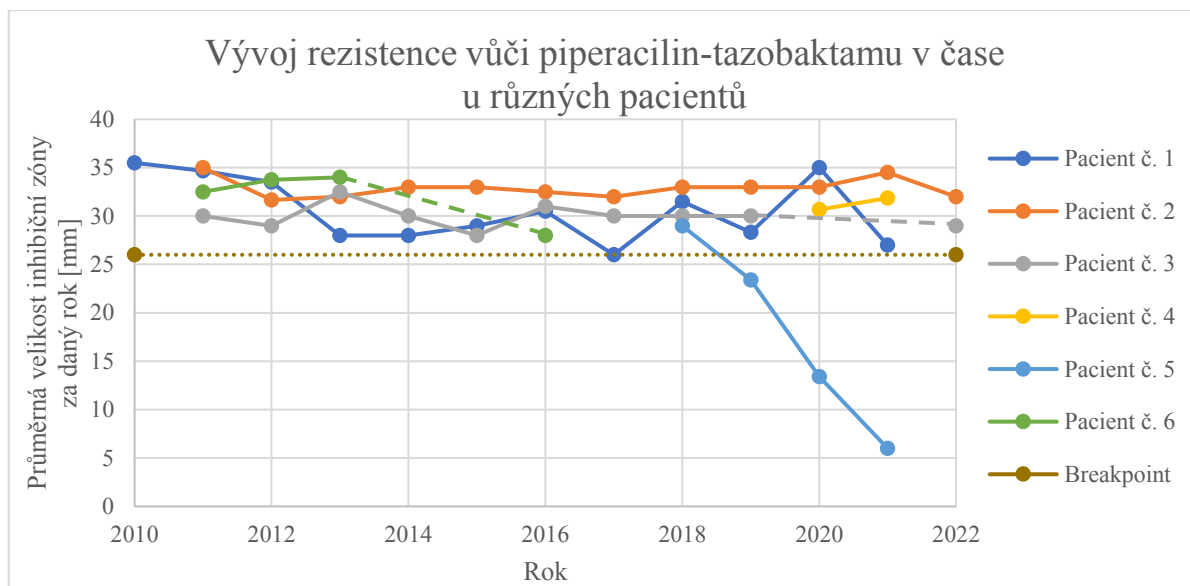
Obrázek 15. Vývoj rezistence vůči kotrimoxazolu v čase u různých pacientů. Izolát *A. insuavis* od pacienta č. 1 byl rezistentní vůči kotrimoxazolu od počátku infekce. Izoláty *A. xylosoxidans* od tří pacientů (č. 2, 4 a 6) byly citlivé, u izolátů od zbývajících dvou pacientů (č. 3 a 5) docházelo k oscilaci mezi hodnotami odpovídajícími citlivým a rezistentním kmenům.



Obrázek 16. Vývoj rezistence vůči imipenemu v čase u různých pacientů. Většina izolátů *Achromobacter* spp. byla citlivá k imipenemu a nedocházelo u nich ke vzniku rezistence v průběhu chronické infekce. Izoláty *A. xylosoxidans* od pacienta č. 5 byly rezistentní po celou dobu infekce, během které navíc docházelo ke snižování velikosti inhibiční zóny.



Obrázek 17. Vývoj rezistence vůči meropenemu v čase u různých pacientů. Většina izolátů *Achromobacter* spp. byla citlivá či intermediálně rezistentní vůči meropenemu. Navíc u *A. xylosoxidans* od dvou pacientů (č. 2 a 4) byl pozorován trend vývoje směřující k rezistenci. Izoláty *A. xylosoxidans* od pacienta č. 5 byly rezistentní po celou dobu infekce, během které navíc docházelo ke snižování velikosti inhibiční zóny.



Obrázek 18. Vývoj rezistence vůči piperacilin-tazobaktamu v čase u různých pacientů. Většina izolátů *Achromobacter* spp. byla vůči piperacilin-tazobaktamu citlivá, nicméně izolát *A. insuavis* od pacienta č. 1 se v roce 2017 dostal na úroveň klinického breakpointu a v roce 2021 se této hodnotě opět přiblížil. Izolát *A. xylosoxidans* od pacienta č. 5 byl původně citlivý, ale v průběhu jednoho roku si vyvinul rezistenci vůči piperacilin-tazobaktamu a ve sledovaném období hodnota průměru inhibiční zóny dále klesala až na hodnotu 6 mm.

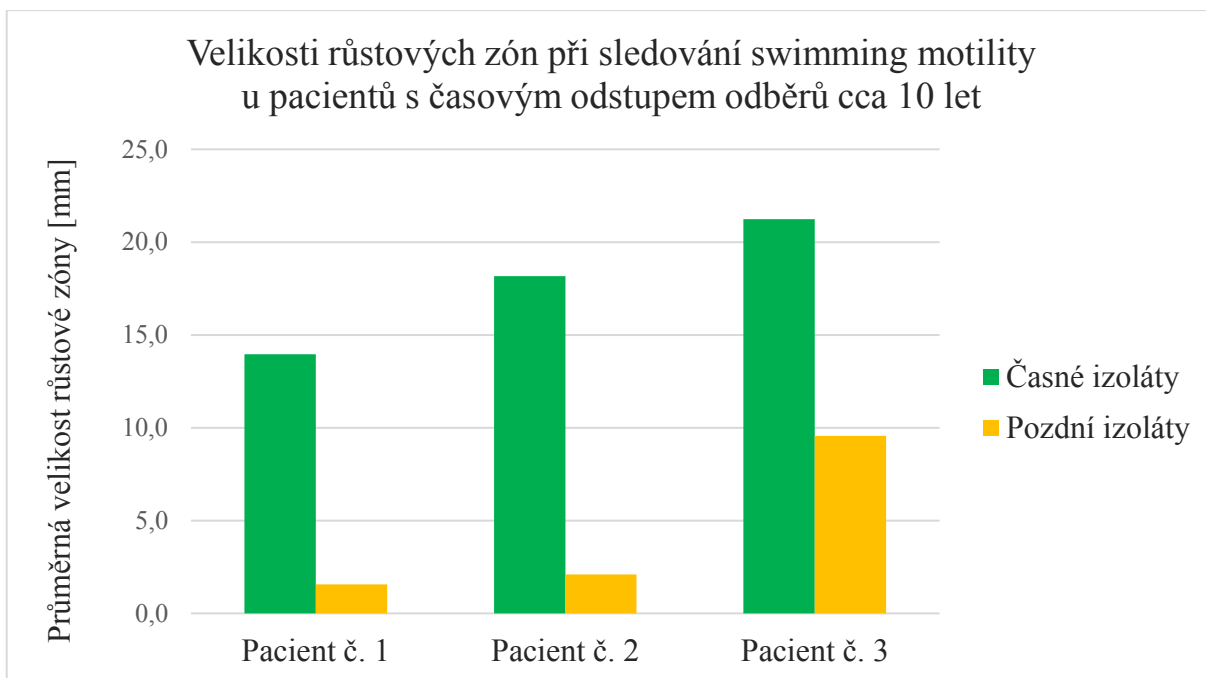
5.3 Stanovení swimming motility

Cíl: Posoudit, zda v průběhu chronické infekce dochází u Achromobacter spp. ke změnám motility, prokázanému adaptačnímu mechanismu na respirační trakt hostitele.

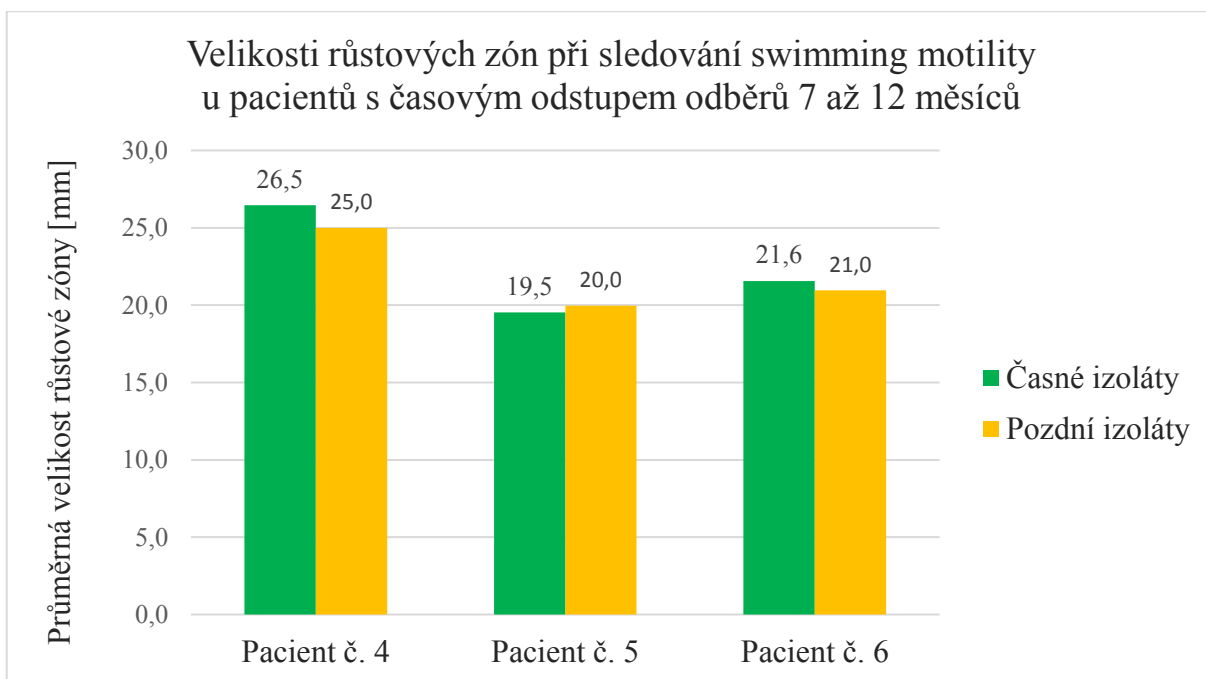
Swimming motilita je způsob pohybu bakterií za pomoci bičků skrz viskózní materiál. Pro vyhodnocení swimming motility jsme změřili průměr růstové zóny, kruhové opalescentní oblasti značící růst bakterií. V případě, že v místě vpichu vyrostla kolonie, která nebyla obklopena opalescentní zónou, byl izolát v tomto pokusu považován za nepohyblivý. Toto kritérium pro nepohyblivé izoláty bylo převzato ze studie, kterou provedli Filipic *et al.* (2017). Výsledky stanovení swimming motility včetně určení přítomnosti motility jsou znázorněny v tabulce 15. Za významné snížení motility bylo považováno zmenšení zóny růstu alespoň o 40 mm (Kalferstova *et al.* 2015). Mezi Izoláty od všech tří pacientů (č 1–3) s odstupem přibližně 10 let vykazovaly významné snížení až ztrátu swimming motility (obrázek 19). Naproti tomu všechny izoláty zbývajících tří pacientů (4–6) odebrané s odstupem do jednoho roku byly motilní. U těchto izolátů jsme nezaznamenali významnou změnu swimming motility, motilita byla buď mírně snížena nebo mírně zvýšená (obrázek 20).

Tabulka 15. Výsledky stanovení swimming motility. Aritmetický průměr velikosti zóny růstu byl vypočten z hodnot tří biologických replikátů (I. – III.). Swimming motilita byla posuzována na základě přítomnosti či nepřítomnosti opalescentní oblasti kolem kolonie narostlé v místě vpichu.

Pacient č.	Časový odstup mezi odběry	Izolát	Velikost zóny růstu [mm]							Směrodatná odchylka [%]	Swimming motilita
			I.	II.	III.	Průměr	Směrodatná odchylka				
1	10,1 let	Časný	14,7	11,9	15,3	14,0	1,8	13,0	ano		
		Pozdní	1,5	1,6	1,6	1,6	0,1	3,7	ne		
2	9,9 let	Časný	18,7	17,3	18,5	18,2	0,8	4,2	ano		
		Pozdní	2,5	2,0	1,8	2,1	0,4	17,2	ne		
3	10,7 let	Časný	20,4	19,4	23,9	21,2	2,4	11,1	ano		
		Pozdní	9,7	9,5	9,5	9,6	0,1	1,2	ano		
4	7,2 měsíců	Časný	21,4	28,0	30,0	26,5	4,5	17,0	ano		
		Pozdní	22,7	20,8	31,5	25,0	5,7	22,8	ano		
5	7,5 měsíců	Časný	20,6	17,0	21,0	19,5	2,2	11,3	ano		
		Pozdní	18,3	19,4	22,2	20,0	2,0	10,1	ano		
6	12,1 měsíců	Časný	18,7	21,4	24,6	21,6	3,0	13,7	ano		
		Pozdní	20,4	17,9	24,6	21,0	3,4	16,1	ano		



Obrázek 19. Změny růstových zón při stanovení swimming motility u izolátů od pacientů s časovým odstupem odběrů cca 10 let.



Obrázek 20. Změny růstových zón při stanovení swimming motility u izolátů od pacientů s časovým odstupem odběrů 7 až 12 měsíců.

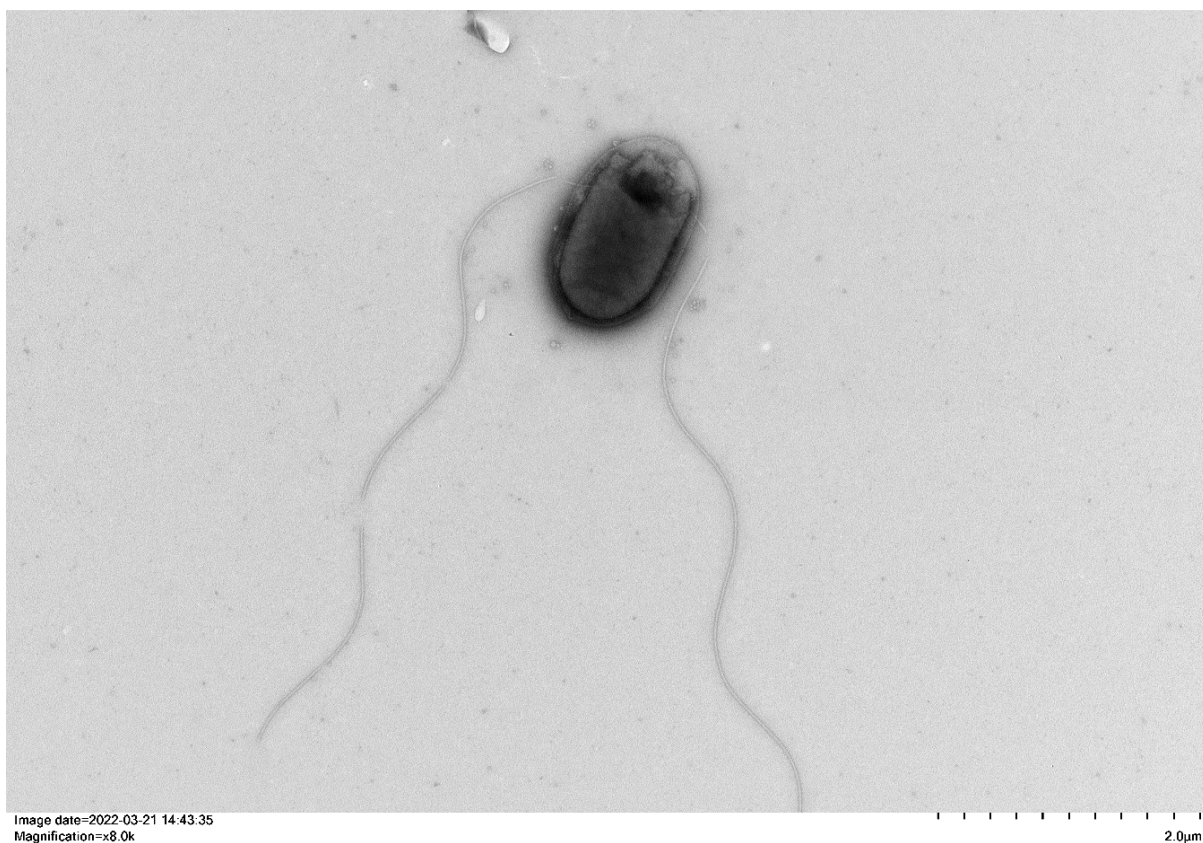
5.4 Transmisní elektronová mikroskopie

Cíl: metodou TEM prokázat přítomnost bičíků a zaznamenat jejich počty připadající na jednotlivé buňky. Přítomnost bičíků je nezbytnou podmínkou swimming motility.

Z použitých metod (viz. kapitoly 4.2.5.1 a 4.2.5.2) jsme dosáhli nejlepších výsledků metodou negativního barvení fyziologického roztoku obsahující bakterie, s barvením 0,5% molybdenanem amonným. Mezi izoláty s odstupem odběru do jednoho roku jsme nepozorovali významné rozdíly. Naproti tomu u časosběrných izolátů od jednotlivých pacientů (č. 1–3), kde od sebe odběry dělilo přibližně 10 let, bylo patrné významné snížení počtu bičíků na buňku. Zatímco u časných izolátů (obrázek 21) jsme napočítali od 3 až po 30 bičíků, u pozdních „nepohyblivých“ izolátů (obrázek 22) se jejich počet pohyboval od žádného po pět bičíků na buňku s průměrným počtem 0–2 bičíky (tabulka 16). Určení počtu bičíků bylo zatíženo chybou plynoucí z obtížného rozpoznání, zda bičíky vycházejí z bakterie nebo pouze procházejí za ní. Falešně zvýšený počet bičíků mohl být dán zlomením bičíku a započtením každé části zvlášť, naopak falešně snížený počet mohl být zaznamenán v důsledku zapletení dvojice bičíků do jednoho svazku.



Obrázek 21. TEM. Časný izolát *A. xylosoxidans* od pacienta č. 2. Zdroj: Mgr. Jan Suchan, NRL pro průkaz infekčních agens elektronovou mikroskopií, SZÚ, Praha.



Obrázek 22. TEM. Pozdní izolát *A. xylosoxidans* od pacienta č. 2. Zdroj: Mgr. Jan Suchan, NRL pro průkaz infekčních agens elektronovou mikroskopií, SZÚ, Praha.

Tabulka 16. Počty bičíků na buňku u časných a pozdních izolátů s časovým odstupem odběrů cca 10 let. Pozdní izoláty pacientů č. 1 a 2 nepohyblivé, ostatní izoláty pohyblivé. Průměrný počet bičíků na buňku byl vypočten z četnosti buněk s konkrétním počtem bičíků. Pro přehlednost byly buňky s daným počtem bičíků rozděleny do tří skupin, odpovídajících množství bičíků v intervalech $n=0$, $n=1-10$ a $n=11-30$.

Pacient č.	Časový odstup mezi odběry	Izolát	Počet buněk s počtem (n) bičíků			Počet pozorovaných buněk	Průměrný počet bičíků na buňku
			$n=0$	$n=1-10$	$n=11-30$		
1	10,1 let	Časný		25	1	26	6
		Pozdní	2			2	0
2	9,9 let	Časný			28	28	19
		Pozdní	2	6		8	2
3	10,7 let	Časný		3	17	20	16
		Pozdní		7		7	5
4	7,2 měsíců	Časný		5		5	7
		Pozdní		9	1	10	8
5	7,5 měsíců	Časný		26		26	5
		Pozdní		7		7	5
6	12,1 měsíců	Časný		3	2	5	10
		Pozdní		9	3	12	8

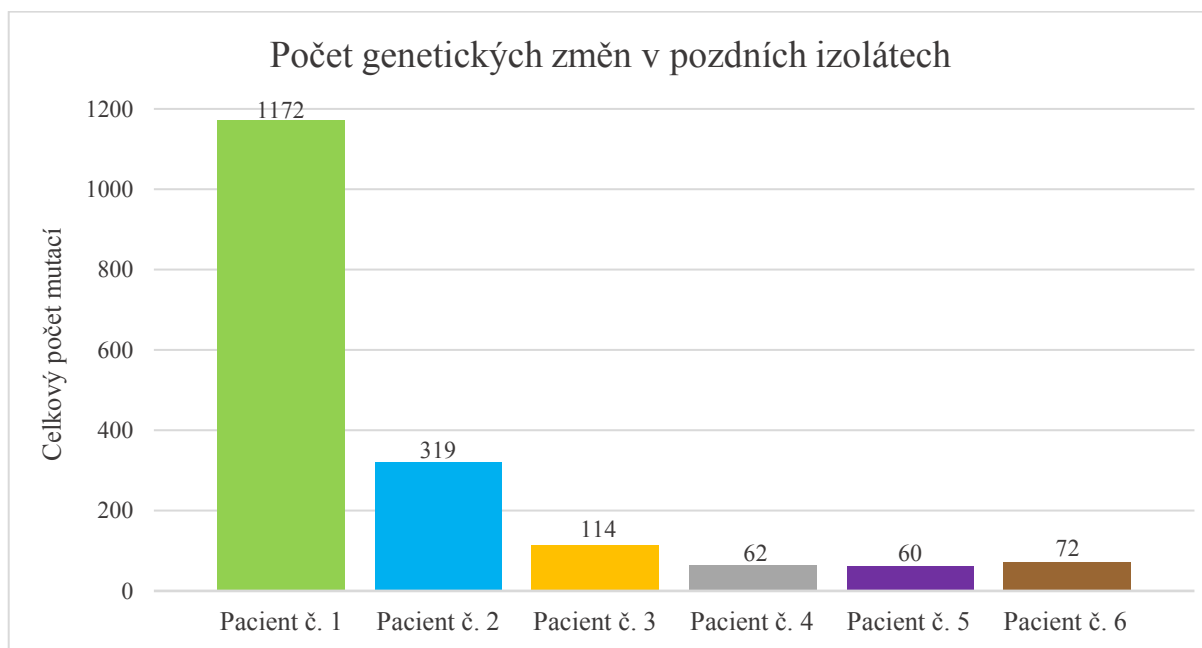
5.5 Bioinformatická analýza genetických změn pozdních izolátů

Cíl: Zjistit adaptační mutace mezi chronologickými izoláty a porovnat jejich počet v závislosti na době odběrů. Potvrdit změny motility a počtu bičíků ve sledovaných fenotypech na úrovni genotypu. Vyhledat možné mutace odpovídající rezistencím vůči antibiotikům a dalším fenotypům.

Pro bioinformatickou analýzu byla použita data z celogenomového sekvenování časných a pozdních izolátů od tří pacientů (č. 1–3) s časovým odstupem odběrů cca 10 let (n=6) a od dalších tří pacientů (č. 4–6) s odstupem 7 až 12 měsíců (n=6). K analýze byly použity online nástroje dostupné na webovém rozhraní Center for Genomic Epidemiology (<https://www.genomicepidemiology.org/>), pomocí kterých jsme porovnali naše data ve formátech FASTQ získaná celogenomovým sekvenováním. Při porovnání časných i pozdních izolátů od šesti pacientů pomocí databáze PlasmidFinder 2.1 (Carattoli *et al.* 2014, <https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) jsme u žádného izolátu nezaznamenali přítomnost plazmidu. Použitím databáze ResFinder 4.1 (Bortolaia *et al.* 2020, <https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>) jsme hledali získané geny pro antimikrobiální rezistenci. U všech izolátů byly potvrzeny geny *bla_{OXA}* pro přirozené β -laktamázy, konkrétně *bla_{OXA-114}* u *A. xylosoxidans* a *bla_{OXA-455}* u *A. insuavis*. Další geny pro rezistenci byly nalezeny pouze u pozdního izolátu pacienta č. 5, konkrétně geny pro rezistenci vůči aminoglykosidům *aph(3')-IIIa* (identita 49,94 % s referenční sekvencí AF330699.1 z genového klastru pro aminoglykosid-streptothricinovou rezistenci *Enterococcus faecium*) a *aadD* (identita 39,24 % s referenční sekvencí M19465.1 z plazmidu pUB110 *Staphylococcus aureus*).

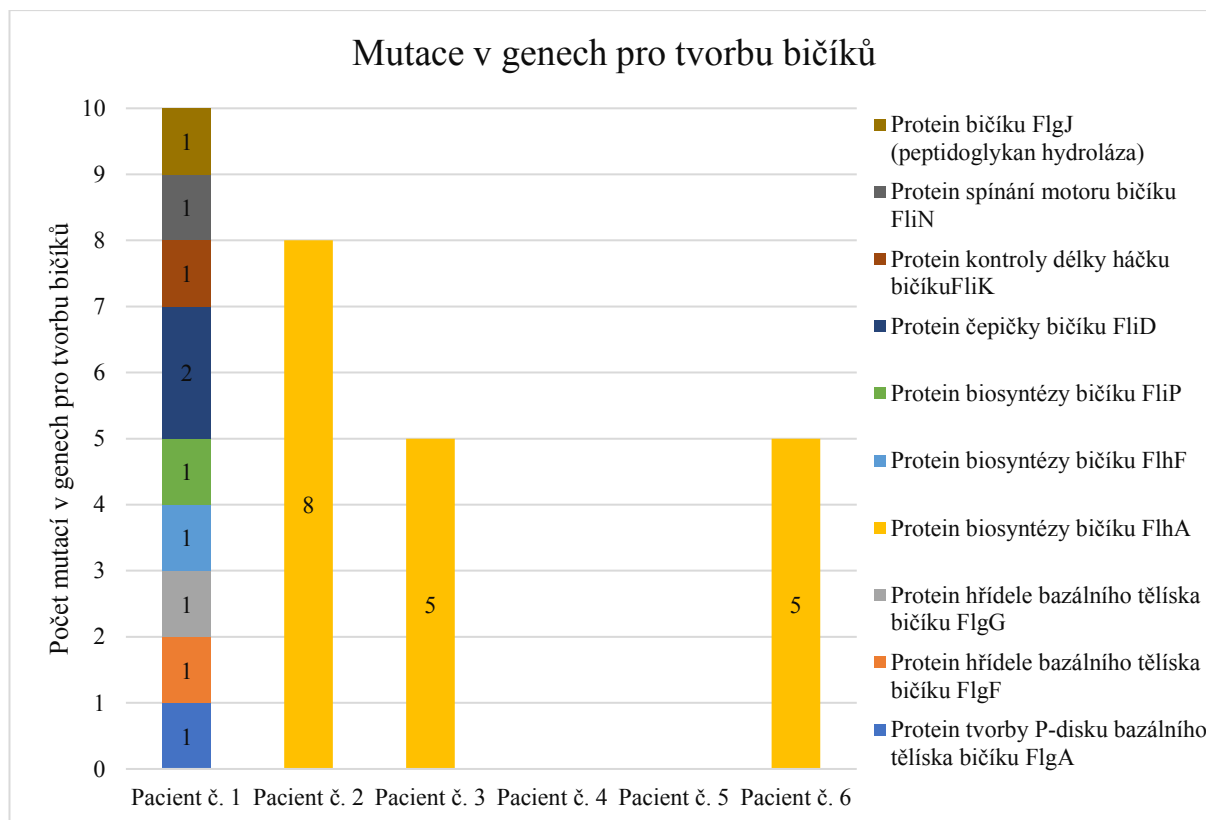
Dále jsme pomocí bioinformatické analýzy hodnotili genetické rozdíly mezi časnými a pozdními izoláty. Celogenomová data časných izolátů byla použita jako referenční sekvence pro srovnání s pozdními izoláty pro získání souboru mutovaných genů. Jako možné adaptabilní mutace byly hodnoceny pouze ty, které se projeví i v sekvenci exprimovaného proteinu. Celkový počet mutací v pozdních izolátech oproti časným izolátům jednotlivých pacientů zobrazuje obrázek 23. V izolátech s časovým intervalem odběrů kolem 10 let byl zaznamenán vyšší počet mutací než mezi izoláty s intervalem odběrů do jednoho roku. Nicméně časný a pozdní izolát *A. insuavis* od pacienta č. 1 od sebe odlišovalo 1172 mutací, několikanásobně více, než bylo zjištěno mezi izoláty ostatních pacientů. U pozdního izolátu zmíněného pacienta (č. 1) jsme detekovali dvě bodové mutace v genu pro faktor spřažený s transkripční opravou (*Transcription-repair coupling factor*), jednu bodovou mutaci genu kódujícího RecA/RadA rekombinázu (*RecA/RadA recombinase*) a jednu bodovou mutaci v genu pro ATP-dependentní

helikázu UvrD/PcrA (*ATP-dependent DNA helicase UvrD/PcrA, EC 3.6.4.12*). U izolátů od pacientů č. 1 a 4 bylo nalezeno více mutací v genu pro Shufflon-specifickou DNA rekombinázu, přičemž pouze jedna z mutací byla shodná u obou izolátů. Celkový seznam zjištěných mutací je uveden v tabulce v příloze 1.



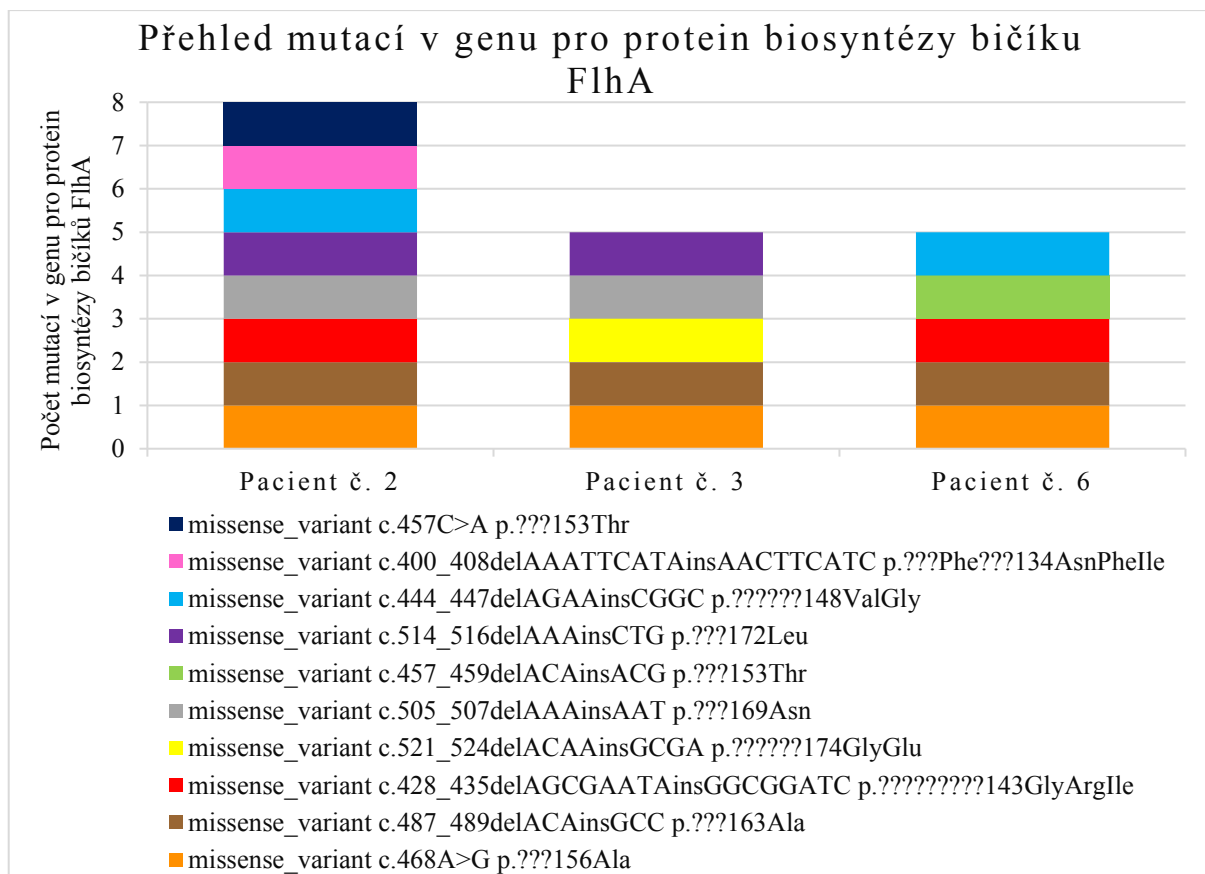
Obrázek 23. Počet genetických změn v pozdních izolátech. U izolátů od pacientů č. 1–3, kdy byl časový interval mezi odběry cca 10 let, bylo zaznamenáno více mutací v porovnání s kratším intervalem. Odběry od pacientů č. 4–6 byly provedeny v časovém období do jednoho roku.

Vzhledem ke zjištění snížení motility i počtu bičíků v průběhu chronické infekce jsme se zaměřili na porovnání genetických změn souvisejících s tvorbou bičíků (obrázek 24). Zjistili jsme, že izoláty od tří pacientů (č. 2, 3 a 6) měli několik mutací v jediném genu pro protein biosyntézy bičíku FlhA. Mezi izoláty pacienta č. 1 jsme detekovali deset mutací v devíti různých genech pro tvorbu bičíků, mezi kterými byly geny pro tvorbu proteinů bazálního tělíska bičíku (FlgA, FlgF, FlgG), geny pro proteiny biosyntézy bičíku (FlhF, FliP) a geny pro protein čepičky bičíku (FliD), kontrolu délky háčku bičíku (FliK), spínání motoru bičíku (FliN) a pro peptidoglykan hydrolázu (FlgJ).



Obrázek 24. Mutace v genech pro tvorbu bičků. Mezi izoláty od pacientů č. 2, 3 a 6 byly zjištěny mutace pouze v genu protein pro biosyntézy bičku FlhA. U izolátů od pacienta č. 1 nebyl gen pro protein FlhA mutován, ale bylo pozměněno devět jiných genů. U izolátů od pacientů č. 4 a 5 nebyly detekovány žádné pozměněné geny související s tvorbou bičků. Hodnoty uvnitř grafického znázornění představují počet mutací v daném genu.

Zjistili jsme, že dvě konkrétní mutace v genu pro protein biosyntézy bičku FlhA jsou totožné pro izoláty od všech tří pacientů (č. 2, 3 a 6) s mutací v tomto genu (obrázek 25). Dále byly zaznamenány čtyři konkrétní mutace, které se shodovaly u izolátů od dvou pacientů (č. 2 a 3; 2 a 6). Pouze čtyři mutace jsme zaznamenali v izolátech jen od jednoho pacienta.



Obrázek 25. Přehled mutací v genu pro biosyntézu bíčičku FlhA. Každá barva značí specifickou mutaci. Některé z mutací se vyskytují v izolátech od vícero pacientů. Legendu tvoří zápis mutací převzatý ze záznamu online nástroje snippy verze 4.6.0 (Seemann 2015, <https://github.com/tseemann/snippy>).

I u některých dalších genů docházelo ke stejným mutacím, kdy specifické mutace byly shodné mezi izoláty od různých pacientů. Mezi těmito geny byly gen pro arsenát reduktázu (u izolátů od pacientů č. 1–3 s intervalem mezi odběry cca 10 let) a pro cytochrom c oxidázu (u izolátů od pacientů č. 3, 4 a 5).

Pozdní izolát od pacienta č. 5, který byl rezistentní vůči karbapenémům a oproti časnému izolátu získal rezistenci na piperacilin-tazobaktam a ceftazidim, obsahoval jako jediný mutace (n=9) v genu pro domnělý transportní protein vnější membrány. Zároveň v tomto izolátu byly nalezeny dvě změny v genu pro efluxní systém typu RND. Mutace tohoto genu byly zaznamenány i v izolátech od pacientů č. 1, 2 a 4, ale nejednalo se o totožné změny. U izolátu od pacienta č. 1 byl efluxní systém typu RND definován jako nespecifický transportní systém pro více léčiv. Z dalších možných efluxních systémů byly nalezeny mutace v genech pro ABC transportní systémy (u izolátů od pacientů č. 1–3), necharakterizované transportéry typu MFS (u izolátů od pacientů č. 1, 3, 4 a 6). U pozdního izolátu od pacienta č. 1 jsme zaznamenali mutaci v genu kódující rodinu β -laktamázy třídy C a penicilin vázajících proteinů.

6 DISKUZE

6.1 Identifikace *Achromobacter* spp.

Pomocí sedmi dříve zmíněných typových kmenů jsme si ověřili, že je lze pomocí systému MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH) správně identifikovat jako rod *Achromobacter*, což je ve shodě s literaturou (Garrigos *et al.* 2021a, Papalia *et al.* 2020b). Nezařazení do druhu může být způsobeno blízkou taxonomickou příbuzností, kdy mohou různé druhy vykazovat podobná proteinová spektra, nebo absencí daného druhu v databázi. Autoři se shodují, že v případě rozšíření databáze o další, i méně časté druhy, by bylo možné využít hmotnostní spektrometrii i pro spolehlivé rozlišení druhů *Achromobacter* spp. (Garrigos *et al.* 2021a, Papalia *et al.* 2020b). Cílem použití MALDI-TOF v naší práci bylo pouze identifikovat rod *Achromobacter*, abychom mohli následně z klinického materiálu vybrat vzorky pro další analýzy. Tohoto dílčího cíle bylo dosaženo.

Pro kontrolu metody identifikace druhu *Achromobacter* spp. sekvenací genu *nrda* jsme provedli sekvenaci zmíněného genu u všech sedmi typových kmenů a porovnali získanou sekvenci s databází PubMLST *Achromobacter* spp. (Jolley *et al.* 2018, https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_achromobacter_seqdef). V souladu s literaturou (Spilker *et al.* 2013, Bador *et al.* 2016) není možné na základě sekvence genu *nrda* o délce fragmentu 449 bp odlišit *A. ruhlandii* od *A. dolens*, ale při analýze sekvence fragmentů o délce 765 bp jsme dosáhli jednoznačného výsledku identifikace.

Pomocí sekvenace genu *nrda* jsme stanovili prevalenci druhů *Achromobacter* spp. u devíti sledovaných pacientů s CF navštěvujících Centrum CF při FN Motol. Identifikovali tři druhy, a to *A. xylosoxidans*, *A. insuavis* a *A. aegrifaciens*. Nejvíce byl zastoupen *A. xylosoxidans* v 67 % případů, což jsme očekávali na základě porovnání s literaturou. Zastoupení druhu *A. xylosoxidans* mezi pacienty s CF se pohybuje od 42 % (Spilker *et al.* 2013) přes 63 % (Papalia *et al.* 2020a) a 64 % (Ridderberg *et al.* 2012) po 71 % (Barrado *et al.* 2013). Překvapilo nás, že jsme nezaznamenali *A. ruhlandii*, který bývá v pořadí druhým nejčastějším druhem s téměř čtvrtinovým podílem infikujícím respirační trakt pacientů s cystickou fibrózou (Spilker *et al.* 2013). Podle Ridderberga *et al.* (2012) bývá *A. ruhlandii* izolován v podstatně nižším zastoupení 7 %, v jiné studii bylo identifikováno 17 % izolátů *Achromobacter* spp. jako druh *A. ruhlandii* (Papalia *et al.* (2020a). Spilker *et al.* (2013) identifikovali jako třetí nejběžnější genoskupinu 14 s výskytem v 17 %, pojmenovanou jako *A. dolens* (Vandamme *et al.* 2013). Ani tento druh jsme mezi sledovanými pacienty nezaznamenali. Druh *A. insuavis*,

přítomný v naší studii ve 22 % (u pacientů č. 1 a 8), bývá často literaturou zařazován do genoskupiny 2 (Vandamme *et al.* 2013). Zaznamenali jsme vyšší prevalenci, než se udává v literatuře zastoupení genoskupiny 2 v rozmezí 10,5 % (Spilker *et al.* 2013) až 14,2 % (Barrado *et al.* 2013). Další zaznamenaný druh, *A. aegrifaciens*, spadající do genoskupiny 5 (Vandamme *et al.* 2013), se v naší studii vyskytoval pouze u jednoho pacienta (č. 7), tj. v 11 % případů. K podobnému výsledku dospěli Spilker *et al.* (2013), kteří zaznamenali genoskupinu 5 v 9,1 % izolátů od pacientů s CF. Podle pracovní skupiny Veschetti *et al.* (2021) nezpůsobuje *A. aegrifaciens* chronické infekce. Nicméně naše výsledky naznačují, by mohl i tento druh způsobit chronickou infekci pacientů s CF. Dle záznamů v interním laboratorním systému MicLab byl od pacienta č. 7 izolován jednorázově *Alcaligenes* spp. v roce 2009 a následně *Achromobacter* spp. v pravidelných intervalech od roku 2016 do poloviny roku 2020. Od tohoto pacienta jsme měli k dispozici pouze jeden izolát z konce roku 2021, který jsme sekvenací genu *nrDA* identifikovali jako *A. aegrifaciens*. Zpětně nelze určit, zda byl pacient po celou dobu trvání chronické infekce infikován stejným klonem, nebo zda došlo k reinfekci. Druhá identifikace a typizace budoucích izolátů *Achromobacter* spp. od zmíněného pacienta (č. 7) by mohla potvrdit nebo vyvrátit naši domněnku, že chronickou respirační infekci je schopen způsobit i *A. aegrifaciens*.

Je nutné podotknout, že jsme prevalenci druhů *Achromobacter* spp. hodnotili pouze u malého vzorku u pacientů s CF (n=9), kteří navštěvují Centrum CF při FN Motol, a zároveň jsou chronicky infikováni *Achromobacter* spp. Rozložení druhů v jiných centrech CF může být odlišné. Zároveň i u sporadických nálezů *Achromobacter* spp. ve sputu pacientů s CF může být jiné zastoupení druhů, neboť některé druhy nemusí vyvolávat chronickou infekci (Veschetti *et al.* 2021). Bylo prokázáno odlišné zastoupení druhů *Achromobacter* spp. u pacientů s CF a pacientů s odlišným rizikovým faktorem, přičemž se shodné pouze dominantní zastoupení *A. xylosoxidans* u obou skupin (Filipic *et al.* 2017).

6.2 Typizace *Achromobacter* spp.

Z výsledků FTIR-spektroskopie jsme se prvotně domnívali, že minimálně tři pacienti (č. 2, ST-175; č. 3, ST-545; č. 5, ST-387) sdílí podobné klony a že mezi nimi mohlo dojít k přenosu infekce. Podezření na přenos *Achromobacter* spp. mezi pacienty s CF bylo zaznamenáno hned v několika studiích (Pereira *et al.* 2011, Cools *et al.* 2016, Garrigos *et al.* 2021b) včetně výskytu asi nejznámějšího epidemického kmene *A. ruhlandii* DES vyskytujícího se zejména u dánských pacientů s CF (Filipic *et al.* 2017, Garrigos *et al.* 2021b).

Tato hypotéza o možném přenosu infekce byla následně vyvrácena pomocí MLST. Nezaznamenali jsme tvorbu klastrů, které by spolehlivě odlišili jednotlivé ST typy od izolátů odlišných ST typů. Pro ST-175, ST-387 a ST-545, u kterých docházelo k nejvýznamnějšímu překryvu vibračních spekter, nebyla ve schématu MLST nalezena alela shodná pro všechny tři ST typy. Vzhledem k tomu, že některé izoláty *A. xylosoxidans* mají vibrační spektrum více podobné s *A. aegrifaciens* či s *A. insuavis* než vzájemně mezi sebou, nelze tuto metodu použít ani pro diferenciaci *Achromobacter* spp. do skupin podle druhu. Metoda FTIR-spektroskopie nebyla vhodnou metodou pro typizaci *Achromobacter* spp. Jde však o novou metodu analyzující zejména strukturální složení bakterií a po případné optimalizaci by mohla mít v budoucnosti významnější uplatnění pro typizaci *Achromobacter* spp. Dnes se úspěšně využívá pro typizaci např. *Klebsiella pneumoniae*, jejíž kmeny dokáže rozlišit s přesností 93 % v porovnání s referenční metodou celogenomového sekvenování (Hu *et al.* 2021).

Pomocí MLST typizace jsme zjistili, že každý pacient (n=6) byl stabilně infikován stejným ST typem, a to i v případech, kdy chronická infekce trvala kolem 10 let. Výjimku tvořil ST-544, který byl u pacienta č. 1 identifikován ve třetím časosběrném izolátu. ST-544 vznikl jednou synonymní nukleotidovou záměnou v genu *eno* pro enolázu (The UniProt Consortium 2021, <https://www.uniprot.org/help/publications>) ze sekvenčního typu ST-144. Z prvního, druhého, a následně i třetího odběru daného pacienta byl izolován původní ST-144. Vzhledem k přítomnosti pouze tohoto jediného rozdílu mezi SST-144 a ST-544 v rámci MLST předpokládáme, že k mutaci došlo *in vivo* v dýchacích cestách pacienta a že se nejedná o infekci novým ST typem. Je pravděpodobné, že v čase odběru mohli být v pacientovi přítomny oba ST typy současně, ale vzhledem k sekvenaci pouze jedné buňky z izolátu jsme zaznamenali jen ST-544. Ridderberg *et al.* (2011) se domnívají, že u pacientů s chronickou infekcí je přítomný stálý klon *Achromobacter* spp., ale přechodně mohou být infikováni i jinými klony. Naši pacienti byli infikováni stále stejným klonem a nedocházelo k reinfekci jiným nepříbuzným ST-typem. Nejsme schopni vyloučit reinfekci v případě, že by došlo k eradikaci *Achromobacter* spp. a následné opětovné infekci původním klonem např. předměty kontaminovanými samotným pacientem před eradikací patogenu. Jelikož by pacienti s CF měli důsledně dodržovat hygienicko-epidemický režim spočívající v pravidelné dezinfekci osobních pomůcek i např. odpadu, k opětovné nákaze z vlastních kontaminovaných pomůcek by docházet nemělo.

Zároveň jsme zjistili, že každý ze sledovaných pacientů (n=6) je infikován jiným ST typem. Ve schématu MLST složeného ze sedmi genů byly vždy v rámci jednoho pacienta

alespoň dvě alely odlišné. Z toho usuzujeme, že se pacienti vzájemně neinfikovali ani nezískali infekci ze stejného zdroje a nalezené bakterie pocházejí z prostředí. K podobnému závěru, kdy nebyl zaznamenán přenos *Achromobacter* spp. mezi pacienty s CF, dospěli i další autoři (Amoureux *et al.* 2013). Naše zjištění se týká pouze pacientů s CF. Pro vyloučení přenosu infekce v zařízeních zdravotní péče by bylo nutné rozšířit studii i na hospitalizované pacienty, kteří netrpí CF.

6.3 Bioinformatická analýza genetických změn pozdních izolátů

V průběhu chronické infekce se bakterie adaptují na podmínky v dýchacích cestách pacientů s CF. Ke krátkodobé adaptaci dochází zejména na úrovni regulace exprese, při dlouhodobé adaptaci se akumulují patoadaptivní mutace (Veschetti *et al.* 2020). Pro nalezení genů, ve kterých došlo k mutaci v období mezi odběry, jsme porovnali sekvence časných a pozdních izolátů, u kterých jsme potvrdili klonalitu. Předpokládali jsme, že v průběhu delšího časového období mezi odběry se mezi izoláty vytvoří více mutací. Při porovnání genetických změn mezi časnými a pozdními izoláty jsme detekovali více mutací u izolátů od pacientů (č. 1–3) s časovým intervalem odběrů cca 10 let, než u pacientů (č. 4–6) s časovým odstupem odběrů do jednoho roku. Vzhledem k poměru počtu mutací vzniklých mezi odběry v intervalech deseti let a do jednoho roku si myslíme, že by adaptace bakterií mohla probíhat ve větší míře během prvních let chronické infekce než v její pozdější fázi. Další studií sledující genetické změny izolátů v pravidelných intervalech odběrů vzorků bude možné tuto hypotézu potvrdit nebo vyvrátit.

Nápadný byl vysoký počet mutací u izolátů *A. insuavis* od pacienta č. 1, který dosahoval více než 3,5násobku druhé nejvyšší hodnoty (zjištěné u izolátů od pacienta č. 2). Vyšší rychlost akumulace mutací je charakteristická pro hypermutátorové kmeny s mutací v genech *mutS* a *mutL* pro proteiny podílející se na opravě chybného párování DNA (Veschetti *et al.* 2020). V našem porovnání sekvencí časného a pozdního izolátu jsme nezaznamenali změny v *mut* genech. Vzhledem k metodě porovnávání změn pouze mezi časným a pozdním izolátem nemůžeme vyloučit možnost hypermutátorového fenotypu zároveň u časného i pozdního izolátu. Mutace v genech *mutS* a *mutL* bychom taktéž nezaznamenali v případě, že by k nim došlo až po odběru časného izolátu a před odběrem pozdního izolátu by proběhly reverzní mutace *mut* genů na původní genotyp. V mutátorovém fenotypu může nastat eliminace mutací v *mut* genech s navrácením původního stavu (Pillon *et al.* 2013).

Ridderberg *et al.* (2015) se ve své studii zahrnující tři izoláty *A. insuavis* a po jednom izolátu *A. xylosoxidans* a *A. ruhlandii* zjistili několikanásobně vyšší počet mutací mezi časosběrnými izoláty *A. insuavis* od jednoho pacienta oproti izolátům ostatních pacientů. Nezjistili přítomnost mutací v genech *mutS* ani *mutL*, ale popsali delecí 112 bp v genu kódujícího DNA alkylační opravný enzym. V naší práci jsme u pozdního izolátu od pacienta č. 1 zaznamenali dvě bodové mutace vedoucí k záměně aminokyselin (z glycinu na valin a z fenylalaninu na leucin) v genu pro faktor spřažený s transkripční opravou, jednu bodovou mutaci v genu kódujícího RecA/RadA rekombinázu (se záměnou prolinu za threonin) a jednu bodovou mutaci v genu pro ATP-dependentní helikázu UvrD/PcrA (se záměnou leucinu za izoleucin). Domníváme se, že v důsledku těchto změn by mohlo častěji docházet ke vzniku mutací v genomu. Dále je potřeba ověřit možnost přítomnosti mutace *mut* genů v časném izolátu. Delece v genu *mutS* u *A. xylosoxidans* byla zaznamenána ve studii provedené Laurou Veschetti *et al.* (2020).

Potvrdili jsme, že fenotypové změny motility a počtu bičíků se odehrávají na podkladě mutací v genomu. Detekovali jsme mutace celkem v deseti genech pro tvorbu bičíků mezi izoláty od pacientů č. 1, 2, 3 a 6, u izolátů od pacientů č. 4 a 5 ke změnám genů kódujících tvorbu bičíků nedošlo. Pozdní izolát *A. insuavis* od pacienta č. 1 byl nepohyblivý ve fenotypovém testu zjišťujícím swimming motilitu a metodou TEM jsme nepozorovali žádné buňky s bičíky. U tohoto izolátu jsme zaznamenali deset mutací v devíti různých genech pro tvorbu bičíků, a to v genech kódujících proteiny bazálního tělíska bičíku, proteiny biosyntézy bičíku, protein čepičky bičíku, kontrolu délky háčku bičíku (FliK), spínání motoru bičíku (FliN) a pro peptidoglykan hydrolázu (FlgJ). Mutaci genu pro protein biosyntézy bičíku FlhA jsme u izolátu od pacienta č. 1 nezaznamenali.

Gen pro protein FlhA byl jediným genem, který byl mutován u izolátů ostatních pacientů (č. 2, 3 a 6). Zjistili jsme, že pro snížení motility bakterií jsou dostačující mutace v tomto jediném genu, což neznamená, že stejný efekt nemohou mít i mutace jiných genů. Izoláty od pacientů č. 2, 3 a 6 měli několik mutací v genu pro protein FlhA, přičemž některé specifické mutace byly společné pro více izolátů. Podobnost mutací může indikovat dosah jednotlivých mutací na změnu fenotypu. Ve fenotypovém testu pro studium swimming motility byl pozdní izolát od pacienta č. 2 nepohyblivý, ale s rozostřenými okraji kolonie. Pozdní izolát od pacienta č. 3 vykazoval v porovnání s časným izolátem výrazné snížení motility a snížení průměrného počtu bičíků na buňku (z 19 na 5 bičíků na buňku). Časný a pozdní izolát od pacienta č. 6 vykazovaly podobnou swimming motilitu i průměrný počet bičíků na buňku.

Porovnání fenotypu a bioinformatických dat (viz. tabulka 25) těchto tří pozdních izolátů (od pacientů č. 2, 3 a 6) nás přivedlo k následující hypotéze: Mutace podílející se na snížení motility a tvorby bičíků pravděpodobně bude přítomná v izolátech od pacientů č. 2 a 3, a zároveň nebude přítomná v izolátu od pacienta č. 6. Domníváme se, že za sníženou motilitu je zodpovědná jedna či obě mutace FlhA proteinu, buď záměna původní aminokyseliny na pozici 172 za leucin, nebo na pozici 169 záměna původní aminokyseliny za asparagin. Vzhledem k rozdílné motilitě a počtu bičíků se nejedná o jediné mutace ovlivňující motilitu sledovaných bakterií. Na dalším snížení motility se může podílet alespoň jedna z mutací, které jsme detekovali pouze u pozdního izolátu od pacienta č. 2. Těmito mutacemi byla bodová mutace vedoucí k záměně původní aminokyseliny za threonin na pozici 153 a záměna trojice aminokyselin za asparagin, fenylalanin a izoleucin na pozici 134 pro první aminokyselinu. Všech devět mutací genu pro FlhA protein bylo detekovaných na pozicích 134 až 175 aminokyselinové sekvence. Dle literatury sdílí sekreční systém bičíků *Pseudomonas* spp. strukturní podobnost se sekrečním systémem typu III (T3SS) podílejícím se na virulenci. Protein FlhA je součástí statického bičíkového modulu vnitřní membrány, kterým dochází k exportu monomerů bičíkových struktur. Společně s FlhB proteinem udává substrátovou specifitu pro export (Berthomieu *et al.* 2009).

Porovnáním dat z celogenomového sekvenování s online databází ResFinder 4.1 (Bortolaia *et al.* 2020, <https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>) byly u izolátů nalezeny geny blaOXA pro přirozené β -laktamázy. Předpokládali jsme, že nalezneme více genů zodpovědných za rezistenci našich izolátů vůči antibiotikům. Jelikož je *Achromobacter* spp. považován za nově se objevující patogen u imunokompromitovaných pacientů, nemusí být ještě v databázích zahrnut. Porovnáním sekvencí FASTQ v databázi PlasmidFinder 2.1 (Carattoli *et al.* 2014, <https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) nebyl nalezen plazmid u žádného z izolátů. Databáze však umožňuje vyhledávání plazmidů pouze pro grampozitivní bakterie a řád Enterobacteriales.

V našem celkovém seznamu zjištěných mutací jsme vyhledávali geny, který by mohly vysvětlit fenotypy rezistence vůči antibiotikům. U pozdního izolátu od pacienta č. 1 jsme zaznamenali bodovou mutaci (záměnu z asparaginu na lysin) v genu kódující rodinu β -laktamáz třídy C a penicilin vázajících proteinů. Tato mutace by mohla souviset se vznikem rezistence vůči ceftazidimu v roce 2013 (viz. obrázek 10 ve výsledcích). Zajímavé je, že v roce 2021 došlo k obnově citlivosti vůči ceftazidimu (viz. obrázek 10). Dále byla u izolátů od pacienta č. 1 nalezena mutace pro efluxní systém typu RND, definovaný jako nespecifický

transportní systém pro více léčiv. Mutace genu kódujícího efluxní systém typu RND byly zaznamenány v izolátech od pacientů č. 1, 2, 4 a 5, ale nejednalo se o totožné změny. Z dalších možných efluxních systémů byly nalezeny mutace v genech pro ABC transportní systémy (u izolátů od pacientů č. 1–3).

Izoláty od pacienta č. 5 se vyznačovaly vysokou mírou rezistence v porovnání s ostatními izoláty. Byly rezistentní na začátku chronické infekce vůči imipenemu a meropenemu a zároveň došlo v průběhu chronické infekce ke vzniku rezistence vůči piperacilin-tazobaktamu a ceftazidimu. Dle záznamu sekvenace metodou Illumina byla v časném i pozdním izolátu nalezena karbapenemáza AXC-4, *Accession number* QEJ74006.1. AXC náleží do skupiny β -laktamáz třídy A. Její hydrolytická aktivita byla prokázána vůči imipenemu a meropenemu (Fleurbaaij *et al.* 2018). Vzhledem k dalšímu snížení velikosti inhibiční zóny imipenemu a meropenemu ve sledovaném období předpokládáme, že hydrolyza β -laktamového kruhu není jediným mechanismem rezistence vůči karbapenemům. Při porovnání genetických změn časného a pozdního izolátu nás zaujal gen pro bezejmenný domnělý transportní protein vnější membrány. V tomto genu jsme detekovali 9 nesynonymních mutací a změny v něm nebyly zjištěny u žádných jiných izolátů z naší studie. U *P. aeruginosa* byl popsán porin vnější membrány OprD, kterým probíhá transport karbapenemů do buněk citlivých vůči karbapenemům. Pokud je protein OprD nefunkční nebo chybí, jsou dané kmeny vůči karbapenemům rezistentní. Přestože homolog proteinu OprD nebyl u *Achromobacter* spp. nalezen (Hu *et al.* 2015), domníváme se, že tento domnělý transportní protein vnější membrány by mohl sloužit jako pro vstup karbapenemů do buněk. Tuto hypotézu však nutné ověřit.

U izolátů od všech pacientů jsme zaznamenali mutace v hypotetických genech. Funkce těchto genů je neznámá a nelze vyloučit jejich podíl na adaptaci bakterií.

6.4 Screening citlivosti vůči antibiotikům v průběhu chronické infekce

V první řadě je nutné podotknout, že diskový difuzní test je pouze kvalitativní metodou, u které je navíc měření průměru inhibiční zóny do značné míry subjektivní. Klinické breakpointy pro tuto metodu jsou stanoveny na základě hodnoty inhibiční zóny, která rozlišuje většinu citlivých a rezistentních izolátů se známou MIC. Pro pokračování studie a dosažení přesnějších výsledků v rámci testování citlivosti bude potřeba vyšetřovat izoláty metodou MIC. Přínos by také mělo posouzení vlivu antibiotik užívaných pacientem v průběhu chronické infekce, nicméně tato data jsme neměli k dispozici.

Ve shodě s literaturou jsme potvrdili, že *Achromobacter* spp. jsou přirozeně rezistentní vůči aminoglykosidům, jako je amikacin, gentamicin, netilmicin a tobramycin (Amoureux *et al.* 2013, Hu *et al.* 2015, Swenson & Sadikot 2015, Filipic *et al.* 2017). Přestože pro ampicilin-sulbaktam není známý klinický breakpoint, růst až k antibiotickému disku odpovídající inhibiční zóně 6 mm lze považovat za rezistenci. Rezistence vůči ampicilin-sulbaktamu nás nepřekvapila, jelikož *A. xylosoxidans* produkuje přirozenou β -laktamázu OXA-114 a pro *A. insuavis* je známá tvorba příbuzné přirozené β -laktamázy OXA-455. OXA-114 hydrolyzuje cefalosporiny nižších generací a některé peniciliny (Isler *et al.* 2020), jako jsou ampicilin a amoxicilin. Zároveň není inhibována inhibitory β -laktamáz, jako je kyselina klavulanová (Bortolaia *et al.* 2020, <https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>).

Naše izoláty *Achromobacter* spp. byly převážně rezistentní vůči fluorochinolonům. Pouze izoláty od pacienta č. 4 odebrané v roce 2021 byly dle průměrné hodnoty inhibiční zóny citlivé k levofloxacinu. Nicméně mezi jednotlivými údaji zaznamenanými v laboratorním informačním systému (MicLab) i v porovnání s našimi výsledky jsme pozorovaly významné rozdíly velikosti inhibiční zóny fluorochinolonů. Tyto rozdíly mohou být způsobeny použitím různých šarží MH agaru pro testy, jelikož dle Fuchse *et al.* (1989) mohou mít jednotlivé šarže MH agaru vliv na velikosti inhibičních zón fluorochinolonů z důvodu variabilního obsahu kationtů. Podle studií jiných autorů (Isler *et al.* 2020, Okoliegbe *et al.* 2020) a je rezistence klinických izolátů *Achromobacter* spp. vůči chinolonům častým jevem. Většina izolátů *Achromobacter* spp. od sledovaných pacientů byla rezistentní vůči cefepimu. Také další autoři se zmiňují o časté rezistenci vůči cefepimu (Sader & Jones 2005).

Antibiotiky, která byla nejčastěji účinná proti *Achromobacter* spp., byly piperacilin-tazobaktam a karbapenemy. Rezistence byla zaznamenána pouze u izolátů od pacienta č. 5, který byl rezistentní ke všem třem zmíněným antibiotikům. Podobného výsledku bylo dosaženo i v dalších studiích (Sader & Jones 2005, Almuzara *et al.* 2010, Gabrielaite *et al.* 2021a). Zatímco vůči imipenemu byly zaznamenány rezistentní izoláty pouze od pacienta č. 5, vůči meropenemu byly intermediálně rezistentní i izoláty dalších tří pacientů (č. 1–3). Navíc u dvou pacientů (č. 2 a 4) byl pozorován trend se snižující se velikostí inhibiční zóny kolem disku meropenemu v důsledku vznikající rezistence. Také Amoureux *et al.* (2013) dospěli k podobnému závěru, že ke vzniku rezistence dochází častěji vůči meropenemu než imipenemu.

Podle literatury je dalším antibiotikem s častou *in vitro* účinností kotrimoxazol (Isler *et al.* 2020, Okoliegbe *et al.* 2020). V naší studii vykazoval antimikrobiální aktivitu po celou

dobu infekce proti izolátům od tří pacientů (č. 2, 4, 6). U dvou pacientů docházelo ke kolísání hodnot citlivosti, které se střídaly s hodnotami odpovídajícími rezistentním kmenům. Izoláty *A. insuavis* od pacienta č. 1 vykazovaly rezistenci, s neměnnou velikostí inhibiční zóny o průměru 6 mm po celou dobu trvání chronické infekce. Získali jsme podezření, že by rezistence mohla souviset s druhem bakterie. Avšak izolát *A. insuavis* od dalšího pacienta (č. 8, který nebyl zahrnut do screeningu citlivosti vůči antibiotikům) byl po celou dobu infekce ke kotrimoxazolu citlivý. Podle autorů (Okoliegbe *et al.* 2020) nesouvisí rezistence vůči kotrimoxazolu s druhem *Achromobacter* spp.

Ceftazidim byl účinný proti izolátům od tří pacientů (č. 3, 4 a 6) po celé období sledování chronické infekce, u izolátů od dalších tří pacientů (č. 1, 2, 5) došlo k rozvoji rezistence. Ceftazidim bývá podle některých autorů nejúčinnějším cefalosporinem proti *Achromobacter* spp. (Sader & Jones 2005). Při porovnání velikosti inhibičních zón ceftazidimu a ceftazidim-avibaktamu jsme naměřili podobné hodnoty. Obsah ceftazidimu v obou discích činil 10 µg a pro oba disky byl stanoven shodný breakpoint 17 mm. Nezaznamenali jsme zvýšenou citlivost kmenů při použití disku s inhibitorem β-laktamáz. Také v literatuře je popisováno, že se nepředpokládá účinnost dnes běžně používaných inhibitorů proti přirozené β-laktamáze OXA-114 (Isler *et al.* 2020). U *Achromobacter* spp. izolovaných z krve při maligních onemocněních s bakteriemií byla popsána citlivost vůči samotnému cefoperazonu u 96 % kmenů (Aisenberg *et al.* 2004). V naší studii jsme zaznamenali velikost inhibiční zóny cefoperazon-sulbaktamu alespoň 25 mm ve sledovaném období u izolátů od pěti pacientů (č. 1, 2, 3, 4 a 6). Hodnota inhibiční zóny izolátů od pacienta č. 5 klesla z 29 mm na 6 mm. K této změně došlo souběžně se vznikem rezistence vůči piperacilin-tazobaktamu, což naznačuje mechanismus rezistence shodný pro obě antibiotika. Vzhledem k našemu pozorování a dříve popsaným výsledkům představuje cefoperazon nadějnou možnost pro léčbu infekcí způsobených *Achromobacter* spp.

V naší studii byla zjištěna rezistence vůči kolistinu u izolátů od dvou ze šesti pacientů (č. 3 a 6). V literatuře je možné narazit na rozličné údaje o citlivosti *Achromobacter* spp. vůči kolistinu. Procento citlivých kmenů se pohybuje od 15 % (Papalia *et al.* 2020a) přes 28 % (Jacquier *et al.* 2012) až po 86 % (Biswas *et al.* 2013). Pro další antibiotikum, tigeckylin, jsme zaznamenali většinu hodnot inhibičních zón v rozmezí 12–25 mm. Z důvodu neznámého klinického breakpointu pro stanovení citlivosti diskovou metodou nemůžeme zhodnotit rezistenci testovaných izolátů. Jacquier *et al.* (2012) pozorovali citlivost vůči tigecklinu u 44 % izolátů *A. xylosoxidans*.

6.5 Změny motility

Při testu swimming motility pomocí dříve popsané metody (Jakobsen *et al.* 2013) využívající pipetování určitého objemu bakteriální suspenze o konkrétní denzitě na povrch 0,3% agaru docházelo k růstu bakterií v kondenzátu na povrchu agaru. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli pro modifikaci metody, spočívající v inokulaci agaru vpichem pomocí kanthalového drátu o průměru 0,5 mm. Vliv tvorby kondenzátu jsme rovněž minimalizovali kultivací ploten obrácených tak, aby se kultivační médium nalézalo v jejich spodní části, tedy opačně než v průběhu běžné kultivace. Úpravou metody jsme dosáhli vzniku větší růstové zóny za současného snížení směrodatné odchylky mezi replikáty v porovnání s původním schématem.

Zjistili jsme, že při chronické infekci způsobené *Achromobacter* spp. dochází v průběhu let ke snížení až ztrátě motility zmíněných bakterií. U izolátů *A. xylosoxidans* (n=2) a *A. insuavis* (n=2) izolovaných od dvou pacientů (č. 1 a 2) s CF došlo v průběhu 10 let ke ztrátě swimming motility, u pozdního izolátu pacienta č. 2 bylo viditelné pouze rozostření okrajů kolonie. U kmene *A. xylosoxidans* (n=2) od pacienta č. 3 došlo během více než 10 let k významnému snížení motility. Zaznamenali jsme zmenšení zóny růstu z původních 21,2 mm na 9,6 mm, tedy o více než 50 %. Tento pacient byl oproti dvěma zmíněným pacientům v lepším zdravotním stavu, např. netrpěl diabetem závislým na CF. Diabetes mellitus je považován za další rizikový faktor pro vznik infekcí (Isler *et al.* 2020). Pacienti s CF mívají k základní diagnóze často přidružený diabetes. U pacientů s CF dochází k vylučování glukózy do sputa, avšak nebyla prokázána korelace mezi koncentrací glukózy ve sputu a diagnózou diabetu (Sambeek *et al.* 2015). Myslíme si, že koncentrace glukózy ve sputu se mohou podílet na adaptaci bakterií, v podobě regulace exprese. U bakterií vyskytujících se v prostředí bohatém na glukózu dochází k přerušení biosyntézy bičků a ztrátě motility. Pokud dojde k vyčerpání glukózy, motilita i biosyntéza bičků se obnoví (Park *et al.* 2016).

Potvrdili jsme naši hypotézu o snížení swimming motility *Achromobacter* spp. v průběhu chronické infekce, vyslovenou na základě jiných studií popisujících sníženou motilitu izolátů od pacientů s CF v porovnání s jinými klinickými izoláty (Filipic *et al.* 2017). U imunokompromitovaných pacientů, kteří netrpí CF, bývají infekce vyvolané *Achromobacter* spp. spíše akutního rázu (Schoch & Cunha 1988). Izoláty od pacientů s jiným rizikovým faktorem než je CF se mohou podobat časným izolátům od pacientů s CF, jelikož k adaptaci bakterií na prostředí v hostiteli dochází až v průběhu chronické infekce. Tuto hypotézu potvrzuje zaznamenané snížení motility, které nastalo mezi odběry s odstupem

cca 10 let. V období do jednoho roku k významnějším změnám motility pravděpodobně nedochází. V naší sbírce časosběrných izolátů jsme měli k dispozici od tří pacientů (č. 1–3) izoláty s celkovým odstupem cca 10 let, nicméně mezi následnými izoláty bylo období kolem 9 let, ze kterých vzorky nemáme. Další studie zaměřené na změny motility *Achromobacter* spp. během chronické infekce by mohli přinést odpovědi, zda ke snížení motility dochází razantně v průběhu např. několika málo let, nebo zda změna nastává postupně během desetiletí. U nefermentujících bakterií ze skupiny *Burkholderia cepacia* komplex bylo zaznamenáno, že až 2 roky před výrazným zhoršením zdravotního stavu pacienta (v podobě cepacia syndromu) dochází ke významnému snížení až ztrátě motility tohoto patogenu (Kalferstova *et al.* 2015). Zda by podobná ztráta motility mohla předznamenávat zhoršení stavu pacientů s infekcí *Achromobacter* spp., prozatím není známo.

Abychom porovnali případné morfologické změny mezi časnými a pozdními izoláty, pozorovali jsme vzorky metodou TEM. Podle literatury mívají *Achromobacter* spp. 1–20 bičků, které jsou uspořádány peritrichně (Busse & Auling 2015). Překvapilo nás, když jsme jich u některých izolátů napočítali podstatně vyšší počet, a to až 30 bičků na buňku. Zároveň v průběhu chronické infekce docházelo k významnému snížení počtu bičků na buňku. Snížení až ztráta motility u izolátů odebraných s odstupem cca 10 let korelovala s pozorováním bakterií pomocí TEM. U dvou pozdních izolátů (od pacientů č. 1 a 2), které jsme označili za nepohyblivé, jsme pozorovali i buňky bez bičků. U pozdního izolátu od pacienta č. 1 jsme dokonce pozorovali pouze buňky bez bičků, nicméně byl sledován pouze malý soubor buněk tohoto izolátu.

Vzhledem k časovému odstavu odběrů cca 10 let jsme předpokládali, že fenotypové změny motility mezi časnými a pozdními izoláty se budou odehrávat na genetickém podkladě a nebudou regulovány pouze změnou exprese genů souvisejících s motilitou. Tato hypotéza byla potvrzena, jak je popsáno výše (viz. kapitola 6.3).

Hlavním argumentem, proč dochází ke snížení nebo ztrátě bičků, je snaha uniknout imunitnímu systému hostitele. Bičky jsou imunogenní strukturou vyvolávající zánětlivou reakci, na které se podílí buněčná i humorální imunita (Behrouz *et al.* 2016).

Plánem dalšího studia *Achromobacter* spp. je sledovat změny motility, počtu bičků, rezistence (metodou MIC) a adaptabilních genů v průběhu chronické infekci v pravidelných intervalech, abychom lépe porozuměli adaptaci tohoto nově se objevujícího patogenu.

7 SOUHRN

Při srovnání identifikačních metod naše výsledky ukazují, že metodou hmotnostní spektrometrie lze rozlišit izoláty *Achromobacter* spp. pouze na úrovni rodů. Pro spolehlivou druhovou identifikaci by bylo potřeba databáze MALDI rozšířit. Druhová identifikace pomocí amplifikace a sekvenace úseku genu *nrda* je spolehlivá pouze při sekvenaci fragmentu o délce 765 bp. Využitím FTIR-spektroskopie jsme od sebe nerozlišili klony ani jednotlivé druhy *Achromobacter* spp. Tato nová typizační metoda vyžaduje optimalizaci pro využití k typizaci a studiu epidemiologie *Achromobacter* spp. Oproti tomu pomocí MLST a celogenomového sekvenování je možné určit klonální strukturu druhů za účelem studia epidemiologie. Na základě profilu MLST s určením ST typu jsme nezaznamenali žádný případ přenosu *Achromobacter* spp. mezi pacienty s CF.

Izoláty *Achromobacter* spp. bývají často rezistentní vůči aminoglykosidům, ampicilin-sulbaktamu, fluorochinolonom a cefepimu. Účinnost jsme nejčastěji zaznamenali k piperacilin-tazobaktamu a karbapenemům, přičemž vůči meropenemu vzniká rezistence snadněji než vůči imipenemu. Antimikrobiální aktivitu vykazují také kotrimoxazol, ceftazidim a kolistin. Významným antibiotikem při léčbě infekcí způsobených *Achromobacter* spp. by se mohl stát cefoperazon.

V průběhu chronické infekce trvající přes deset let došlo u izolátů *Achromobacter* spp. ke snížení počtu bičíků na buňku doprovázeného snížením až ztrátou swimming motility, pro kterou je přítomnost bičíků nezbytná. Bioinformatickou analýzou na podkladě dat získaných celogenomovou sekvenací jsme prokázali, že k fenotypovým změnám motility dochází na úrovni genotypu v důsledku mutací genů zodpovědných za tvorbu bičíků. Vznik nových mutací jsme detekovali porovnáním genomů časného a pozdního izolátu od téhož pacienta. U longitudinálních izolátů odebraných s odstupem kolem 10 let byl detekován vyšší počet mutací než u izolátů odebraných v intervalu do jednoho roku.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aisenberg, G., K. V. Rolston, A. Safdar. 2004. Bacteremia Caused by *Achromobacter* and *Alcaligenes* Species in 46 Patients with Cancer (1989–2003). *CANCER*. 101 (9): 2134-2140.

Alikhani, M. Y., Z. K. Tabar, F. Mihani, E. Kalantar, P. Karami, M. Sadeghi, S. A. Khosroshahi, S. Farajnia. Antimicrobial Resistance Patterns and Prevalence of blaPER-1 and blaVEB-1 Genes Among ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in West of Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 7 (1): 1-5.

Almuzara, M., A. Limansky, V. Ballerini, L. Galanternik, A. Famiglietti, C. Vay. 2010. In vitro susceptibility of *Achromobacter* spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods. *Int J Antimicrob Agents.* 35 (1): 68-71.

Amoureux, L., J. Bador, E. Siebor, N. Taillefumier, A. Fanton, C. Neuwirth. 2013. Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: First French data. *J Cyst Fibros.* 12 (2): 170-176.

Aziz, R. K., D. Bartels, A. A. Best, M. DeJongh, T. Disz, R. A. Edwards, K. Formsma, S. Gerdes, E. M. Glass, M. Kubal. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* 9 (75): 1-15.

Bador, J., C. Neuwirth, P. Liszczyński, M.-C. Mézier, M. Chrétiennot, E. Grenot, A. Chapuis, C. G. de Curraize, L. Amoureux. 2016. Distribution of innate efflux-mediated aminoglycoside resistance among different *Achromobacter* species. *New Microbes and New Infections.* 10: 1-5.

Bador, J., L. Amoureux, J.-M. Duez, A. Drabowicz, E. Siebor, C. Llanes, C. Neuwirth. 2011. First Description of an RND-Type Multidrug Efflux Pump in *Achromobacter xylosoxidans*, AxyABM. *Antimicrob Agents Chemother.* 55 (10): 4912-4914.

Bador, J., L. Amoureux, E. Blanc, C. Neuwirth. 2013. Innate Aminoglycoside Resistance of *Achromobacter xylosoxidans* Is Due to AxyXY-OprZ, an RND-Type Multidrug Efflux Pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 57 (1): 603-605.

Baker-Austin, C., M. S. Wright, R. Stepanauskas, J. V. McArthur. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology.* 14 (4): 176-182.

- Barrado, L., P. Brañas, M. Á. Orellana, M. T. Martínez, G. García, J. R. Otero, F. Chaves. 2013.** Molecular Characterization of *Achromobacter* Isolates from Cystic. *J Clin Microbiol.* 51 (6): 1927-1930.
- Behrouz, B., N. Amirmozafari, N. Khoramabadi, M. Bahroudi, P. Legae, M. Mahdavi. 2016.** Cloning, Expression, and Purification of *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin, and Characterization of the Elicited Anti-Flagellin Antibody. *Iran Red Crescent Med J.* 18 (6): 1-9.
- Berthomieu, C., R. Hienerwadel. 2009.** Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis Research.* 101: 157-170.
- Biswas, S., J.-C. Dubus, M. Reynaud-Gaubert, N. Stremler, J.-M. Rolain. 2013.** Evaluation of colistin susceptibility in multidrug-resistant clinical isolates from cystic fibrosis, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 32: 1461-1464.
- Bortolaia, V., R. F. Kaas, E. Ruppe, M. C. Roberts, S. Schwarz, V. Cattoir, A. Philippon, R. L. Allesoe, A. R. Rebelo, A. R. Florensa, et al. 2020.** ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 75 (12): 3491-3500.
- Bouteiller, M., C. Dupont, Y. Bourigault, X. Latour, C. Barbey, Y. Konto-Ghiorgi, A. Merieau. 2021.** *Pseudomonas* Flagella: Generalities and Specificities. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (3337): 1-28.
- BSAC: British Society for Antimicrobial Chemotherapy. 2013.** "Table 8. MIC and zone diameter breakpoints for *Pseudomonas* spp." Version 12. 2013. Dostupné z: https://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-12-Apr-2013_final.pdf
- Busse, H.-J., G. Auling. 2015.** *Achromobacter*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* 1-14. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm00926
- Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. 2018.** "Appendix 8, Summary of F508del Mutation Testing." Ottawa: 2018. *Clinical Review Report: Lumacaftor/Ivacaftor (Orkambi)*. Vertex Pharmaceuticals (Canada) Incorporated. Indication: For the treatment of cystic fibrosis in patients aged six years and older who are homozygous for the F508del mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540352/?report=reader>

Carattoli, A., E. Zankari, A. Garcia-Fernandez, L. M. Voldby, O. Lund, L. Villa, F. M. Aarestrup, H. Hasman. PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 58 (7): 3895-903.

Carbonnelle, E., C. Mesquita, E. Bille, N. Day, B. Dauphin, J.-L. Beretti, A. Ferroni, L. Gutmann, X. Nassif. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry.* 44 (1): 104-109.

Carleton, A., B. Casserly, L. Power, B. Linnane, G. O'Flaherty, J. Powell, P. Hartnett, J. Collins, P. Murphy, D. Kenna, et al. 2014. Clustered multidrug-resistant *Bordetella pertussis* in adult cystic fibrosis patients in Ireland: case report and review of antimicrobial therapies. *JMM Case Reports.* 1: 1-6.

Caverly, L. J., T. Spilker, L. M. Kalikin, T. Stillwell, C. Young, D. B. Huang, J. J. LiPuma. 2020. In Vitro Activities of β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Antimicrobial Agents against Cystic Fibrosis Respiratory Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 64 (1): 1-4.

Cools, P., E. Ho, K. Vranckx, P. Schelstraete, B. Wurth, H. Franckx, G. Ieven, L. Van Simaey, S. Van daele, S. Verhulst, et al. 2016. Epidemic *Achromobacter xylosoxidans* strain among Belgian cystic fibrosis patients and review of literature. *BMC Microbiol.* 16 (122): 1-28.

Coward, A., T. D. D. Kenna, C. Perry, K. Martin, M. Doumith, J. F. Turton. 2016. Use of *nrdA* gene sequence clustering to estimate the prevalence of different *Achromobacter* species among Cystic Fibrosis patients in the UK. *J Cyst Fibros.* 15 (4): 479-485.

Cystic, Fibrosis Foundation. 2021. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2020 Annual Data Report. Dostupné z: <https://www.cff.org/sites/default/files/2021-11/Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>.

Ellis, D. I., R. Goodacre. 2006. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *The Analyst.* 131 (8): 875-885.

EUCAST: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2022. "Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0. 2022. <http://www.eucast.org>." Dostupné z <http://www.szu.cz/klinicke-breakpointy>.

- Feng, B., H. Shi, F. Xu, F. Hu, J. He, H. Yang, C. Ding, W. Chen, S. Yu. 2020.** FTIR-assisted MALDI-TOF MS for the identification and typing of bacteria. *Analytica Chimica Acta*. 1111: 75-82.
- Fila, L. 2014.** Cystická fibróza u dospělých. *Interní medicína pro praxi*. 16 (2), 54-60.
- Fila, L. 2021.** Elexakaftor: modulátor proteinu CFTR nové generace. *Farmakoterapeutická revue*. 5: 1-3.
- Filipic, B., M. Malesevic, Z. Vasiljevic, J. Lukic, K. Novovic, M. Kojic, B. Jovcic. 2017.** Uncovering Differences in Virulence Markers Associated with Achromobacter Species of CF and Non-CF Origin. *Front Cell Infect Microbiol*. 7: 1-28.
- Fleurbaij, F., A. A. Henneman, J. Corver, C. W. Knetsch, W. K. Smits, S. T. Nauta, M. Giera, I. Dragan, N. Kumar, T. D. Lawley, et al. 2018.** Proteomic identification of Axc, a novel beta-lactamase with carbapenemase activity in a meropenem-resistant clinical isolate of Achromobacter xylosoxidans. *Sci Rep*. 8 (8181): 8-12.
- Fuchs, P. C., R. N. Jones, A. L. Barry, T. L. Gavan. 1989.** Ofloxacin Susceptibility Testing Quality Control Parameters for Microdilution and Disk Diffusion, and Confirmation of Disk Diffusion Interpretive Criteria. *J Clin Microbiol*. 27 (1): 49-52.
- Furlan, J. P. R., E. G. Stehling. 2017.** High-level of resistance to β -lactam and presence of β -lactamases encoding genes in Ochrobactrum sp. and Achromobacter sp. isolated from soil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 11: 133-137.
- Gabrielaite, M., F. C. Nielsen, H. K. Johansen, R. L. Marvig. 2021b.** Achromobacter spp. genetic adaptation in cystic fibrosis. *Microbial Genomics*. 7 (7): 1-13.
- Gabrielaite, M., J. A. Bartell, N. Nørskov-Lauritsen, T. Pressler, F. C. Nielsen, H. K. Johansen, R. L. Marvig. 2021a.** Transmission and Antibiotic Resistance of Achromobacter in Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol*. 59 (4): 1-25.
- Galani, I., F. Kontopidou, M. Souli, P.-D. Rekatsina; E. Koratzanis, J. Deliolanis, H. Giamarellou. 2008.** Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. *Int J Antimicrob Agents*. 31 (5): 434-439.

- Garrigos, T., C. Neuwirth, A. Chapuis, J. Bador, L. Amoureux, E. André, E. Barbier, J. Caillon, E. C. Martin, V. Cattoir, et al. 2021a.** Development of a database for the rapid and accurate routine identification of *Achromobacter* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Clin Microbiol Infect.* 27 (1): 126.e1-126.e5.
- Garrigos, T., M. Dollat, A. Magallon, A. Chapuis, V. Varin, J. Bador, N. Makki, L. Cremet, E. Persyn, E. Cardot-Martin, et al. 2021b.** Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Detection of Isolates Belonging to the Epidemic Clones *Achromobacter xylosoxidans* ST137 and *Achromobacter ruhlandii* DES from Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol.* 59 (10): 1-19.
- Ghasemnejad, A., M. Doudi, N. Amirmozafari. 2019.** The role of the blaKPC gene in antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Microbiol.* 11 (4): 288-293.
- Green, E. R., J. Meccas. 2016.** Bacterial Secretion Systems: An overview. *Microbiology spectrum.* 4 (1): 1-19.
- Hakkak, A. M., M. Keramatipour, S. Talebi, A. Brook, J. T. Afshari, A. Raazi, H. R. Kianifar. 2013.** Analysis of CFTR Gene Mutations in Children with Cystic Fibrosis, First Report from North-East of Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 16 (8): 917-921.
- Hasman, H., D. Saputra, T. Sicheritz-Ponten, O. Lund, C. A. Svendsen, N. Frimodt-Møller, F. M. Aarestrup. 2014.** Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 52 (1): 139-146.
- Horsley, A., A. M. Jones. 2012.** Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation. *Cochrane Database Syst Rev.* 10: CD009529
- Hu, Y., H. Zhou, J. Lu, Q. Sun, C. Liu, Y. Zeng, R. Zhang. 2021.** Evaluation of the IR Biotyper for *Klebsiella pneumoniae* typing and its potentials in hospital hygiene management. *Microbial Biotechnology.* 14 (4): 1343-1352.
- Hu, Y., Y. Zhu, Y. Ma, F. Liu, N. Lu, X. Yang, C. Luan, Y. Yi, B. Zhu. 2015.** Genomic Insights into Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 59 (2): 1152-1161.

- Isler, B., T. J. Kidd, A. G. Stewart, P. Harris, D. L. Paterson. 2020.** Achromobacter Infections and Treatment Options. *Antimicrob Agents Chemother.* 64 (11): 1-35.
- Jacquier, H., A. Le Monnier, E. Carbonnelle, S. Corvec, M. Illiaquer, E. Bille, J.-R. Zahar, F. Jauréguy, V. Fihman, J. Tankovic, et al. 2012.** In Vitro Antimicrobial Activity of “Last-Resort” Antibiotics Against Unusual Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Clinical Isolates. *Microbial Drug Resistance.* 18 (4): 396-401.
- Jakobsen, T. H., M. A. Hansen, P. Ø. Jensen, L. Hansen, L. Riber, A. Cockburn, M. Kolpen, C. R. Hansen, W. Ridderberg, S. Eickhardt, et al. 2013.** Complete Genome Sequence of the Cystic Fibrosis Pathogen *Achromobacter xylosoxidans* NH44784-1996 Complies with Important Pathogenic Phenotypes. *PLoS One.* 8 (7): 1-17.
- Jeukens, J., L. Freschi, A. T. Vincent, J.-G. Emond-Rheault, I. Kukavica-Ibrulj, S. J. Charette, R. C. Levesque. 2017.** A Pan-Genomic Approach to Understand the Basis of Host Adaptation in *Achromobacter*. *Genome Biol Evol.* 9 (4): 1030-1046.
- Jolley, K. A., J. E. Bray, M. C. J. Maiden. 2018.** Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 3 (124): 1-20.
- Kalferstova, L., M. Kolar, L. Fila, J. Vavrova, P. Drevinek. 2015.** Gene Expression Profiling of *Burkholderia cenocepacia* at the Time of Cepacia Syndrome: Loss of Motility as a Marker of Poor Prognosis? *J Clin Microbiol.* 53 (5): 1515-1522.
- Khor, S. Y., M. Jegathesan. 1983.** Heavy metal and disinfectant resistance in clinical isolates of gram-negative rods. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 14 (2): 199-203.
- Kociánová, J. 2017.** Spirometrie – základní vyšetření funkce plic. *Vnitřní lékařství.* 63 (11): 889-894.
- Kolpen, M., M. Kühl, T. Bjarnsholt, C. Moser, C. R. Hansen, L. Liengaard, A. Kharazmi, T. Pressler, N. Høiby, P. Ø. Jensen. 2014.** Nitrous Oxide Production in Sputum from Cystic Fibrosis Patients with Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *PLoS ONE.* 9 (1): 1-9.
- Kostrzewa, M., K. Sparbier, T. Maier, S. Schubert. 2013.** MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clin. Appl.* 7: 767-778.

- Li, X., Y. Hu, J. Gong, L. Zhang, G. Wang. 2013.** Comparative genome characterization of *Achromobacter* members reveals potential genetic determinants facilitating the adaptation to a pathogenic lifestyle. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97 (12): 6413-6425.
- Magallon, A., M. Roussel, C. Neuwirth, J. Tetu, A.-C. Cheikh, B. Boulet, V. Varin, V. Urbain, J. Bador, L. Amoureux. 2021.** Fluoroquinolone resistance in *Achromobacter* spp.: substitutions in QRDRs of GyrA, GyrB, ParC and ParE and implication of the RND efflux system AxyEF-OprN. *J Antimicrob Chemother.* 76 (2): 297-304.
- Maiden, M. C. J. 2006.** Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 561-588.
- Mantovani, R. P., C. E. Levy, T. Yano. 2012.** A heat-stable cytotoxic factor produced by *Achromobacter xylosoxidans* isolated from Brazilian patients with CF is associated with in vitro increased proinflammatory cytokines. *J Cyst Fibros.* 11 (4): 305-311.
- Okoliegbe, I. N., K. Hijazi, K. Cooper, C. Ironside, I. M. Gould. 2020.** Longitudinal Surveillance and Combination Antimicrobial Susceptibility Testing of Multidrug-Resistant *Achromobacter* Species from Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 64 (11): 1-20.
- Papalia, M., C. Steffanowski, G. Traglia, M. Almuzara, P. Martina, L. Galanternik, C. Vay, G. Gutkind, M. S. Ramírez, M. Radice. 2020a.** Diversity of *Achromobacter* species recovered from patients with cystic fibrosis, in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología.* 52 (1): 13-18.
- Papalia, M., R. Figueroa-Espinosa, C. Steffanowski, C. Barberis, M. Almuzara, R. Barrios, C. Vay, G. Gutkind, J. Di Conza, M. Radice. 2020b.** Expansion and improvement of MALDI-TOF MS databases for accurate identification of *Achromobacter* species. *Journal of Microbiological Methods.* 172 (105889): 1-4.
- Park, S., Y.-H. Park, C.-R. Lee, Y.-R. Kim, Y.-J. Seok. 2016.** Glucose induces delocalization of a flagellar biosynthesis protein from the flagellated pole. *Molecular Microbiology.* 101 (5): 795-808.
- Pereira, R. H. V., A. P. Carvalho-Assef, R. M. Albano, T. W. Folescu, M. C. M. F. Jones, R. S. Leão, E. A. Marques. 2011.** *Achromobacter xylosoxidans*: Characterization of Strains in Brazilian Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol.* 49 (10): 3649-3651.

- Pettit, R. S., C. Fellner. 2014.** CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *Pharmacy and Therapeutics*. 39 (7): 500-511.
- Peymani, A., T. Naserpour-Farivar, E. Zare, K. H. Azarhoosh. 2017.** Distribution of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M genes among ESBL-producing *P. aeruginosa* isolated from Qazvin and Tehran hospitals, Iran. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. 58 (2): 1-16.
- Pickrum, A. M., O. DeLeon, A. Dirck, M. H. Tessmer, M. O. Riegert, J. A. Bille, N. A. Ledebor, J. R. Kirby, D. W. Frank. 2020.** *Achromobacter xylosoxidans* Cellular Pathology Is Correlated with Activation of a Type III Secretion System. *Infection and Immunity*. 88 (7): e00136-20
- Pillon, M. C., M. Dubinsky, R. N. Johnston, S.-L. Liu, A. Guarné. 2013.** Characterization of the defects in the ATP lid of *E. coli* MutL that cause transient hypermutability. *DNA Repair*. 12 (10): 864-869.
- Ridderberg, W., K. E. M. Bendstrup, H. V. Olesen, S. Jensen-Fangel, N. Nørskov-Lauritsen. 2011.** Marked increase in incidence of *Achromobacter xylosoxidans* infections caused by sporadic acquisition from the environment. *J Cyst Fibros*. 10 (6): 466-469.
- Ridderberg, W., S. M. Nielsen, N. Nørskov-Lauritsen. 2015.** Genetic Adaptation of *Achromobacter* sp. during Persistence in the Lungs of Cystic Fibrosis Patients. *PLoS ONE*. 10 (8): 1-14.
- Ridderberg, W., M. Wang, N. Nørskov-Lauritsen. 2012.** Multilocus Sequence Analysis of Isolates of *Achromobacter* from Patients with Cystic Fibrosis Reveals Infecting Species Other than *Achromobacter xylosoxidans*. *J Clin Microbiol*. 50 (8): 2688-2694.
- Sader, H. S., R. N. Jones. 2005.** Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 25 (2): 95-109.
- Sambeek, L. V., E. S. Cowley, D. K. Newman, R. Kato. 2015.** Sputum Glucose and Glycemic Control in Cystic Fibrosis-Related Diabetes: A Cross-Sectional Study. *PLoS ONE*. 10 (3): 1-10.
- Seemann, T. 2015.** Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. <https://github.com/tseemann/snippy>.

- Shin, K. S., K. Han, J. Lee, S. B. Hong, B. R. Son, S. J. Youn, J. Kim, H. S. Shin. 2005.** Imipenem-resistant *Achromobacter xylosoxidans* carrying blaVIM-2-containing class 1 integron. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 53 (3): 215-220.
- Schmitt, J., H.-C. Flemming. 1998.** FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 41 (1): 1-11.
- Schoch, P. E., B. A. Cunha. 1988.** Nosocomial *Achromobacter xylosoxidans* Infections. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 9 (2): 84-87.
- Smith, R. W., K. Downey, N. Snow, S. Dell, W. G. Smith. 2015.** Association among fraction of exhaled nitrous oxide, bronchodilator response and inhaled corticosteroid type. *Canadian Respiratory Journal*. 22 (3): 153-156.
- Spilker, T., P. Vandamme, J. J. LiPuma. 2012.** A Multilocus Sequence Typing Scheme Implies Population Structure and Reveals Several Putative Novel *Achromobacter* Specie. *J Clin Microbiol*. 50 (9): 3010-3015.
- Spilker, T., P. Vandamme, J. J. LiPuma. 2013.** Identification and distribution of *Achromobacter* species in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 12 (3): 298-301.
- Swenson, C. E., R. T. Sadikot. 2015.** *Achromobacter* Respiratory Infections. *AnnalsATS*. 12 (2): 252-258.
- The UniProt Consortium. 2021.** UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*. 49 (D1): D480-D489.
- Tsering, D. C., S. Das, L. Adhiakari, R. Pal, T. S. Singh. 2009.** Extended Spectrum Beta-lactamase Detection in Gram-negative Bacilli of Nosocomial Origin. *J Global Infect Dis*. 1 (2): 1-16.
- Vandamme, P., E. R. B. Moore, M. Cnockaert, C. Peeters, L. Svensson-Stadler, K. Houf, T. Spilker, J. J. LiPuma. 2013.** Classification of *Achromobacter* genogroups 2, 5, 7 and 14 as *Achromobacter insuavis* sp. nov., *Achromobacter aegrifaciens* sp. nov., *Achromobacter anxifer* sp. nov. and *Achromobacter dolens* sp. nov., respectively. *Syst Appl Microbiol*. 36 (7): 474-482.

- Vankeerberghen, A., H. Cuppens, J.-J. Cassiman. 2002.** The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros.* 1 (1): 13-29.
- Veschetti, L., A. Sandri, H. K. Johansen, M. M. Lleò, G. Malerba. 2020.** Hypermutation as an Evolutionary Mechanism for *Achromobacter xylosoxidans* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Pathogens.* 9 (72): 1-10.
- Veschetti, L., A. Sandri, C. Patuzzo, P. Melotti, G. Malerba, M. M. Lleo. 2021.** Genomic characterization of *Achromobacter* species isolates from chronic and occasional lung infection in cystic fibrosis patients. *Microbial Genomics.* 7 (7): 1-12.
- Yabuuchi, E., A. Ohyama. 1971.** *Achromobacter xylosoxidans* n. sp. from Human Ear Discharge. *Japanese Journal of Microbiology.* 15 (5): 477-481.
- Yabuuchi, E., I. Yano. 1981.** *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 31 (4): 477-478.
- Yabuuchi, E., I. Yano, S. Goto, E. Tanimura, T. Ito, A. Ohyama. 1974.** Description of *Achromobacter xylosoxidans* Yabuuchi and Ohyama 1971. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 24 (4): 470-477.
- Yong, D., K. Lee, J. H. Yum, H. B. Shin, G. M. Rossolini, Y. Chong. 2002.** Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo- β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 20 (10): 3798-3801.

PŘÍLOHA 1

Název: Celkový seznam zjištěných mutací

Forma: CD-R, typ souboru Microsoft Excel

Popis: Tabulka se zjištěnými adaptačními mutacemi byla vytvořena na základě rozdílů v sekvenovaných genomech časných a pozdních izolátů.