

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Ústav lékařské mikrobiologie

**Alice Michálková**

**Zavedení diagnostiky nových bakteriálních  
patogenů *Ralstonia* a *Achromobacter*  
izolovaných od pacientů s cystickou fibrózou  
a stanovení jejich citlivosti k antibiotikům**

***Bakalářská práce***

Praha 2012

Autor práce: **Alice Michálková**

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

Konzultant práce: **Mgr. Jan Tkadlec**

Oponent práce: **MUDr. Eliška Běbrová**

Datum obhajoby: **2012**

## Bibliografický záznam

MICHÁLKOVÁ, Alice. *Zavedení diagnostiky nových bakteriálních patogenů Ralstonia a Achromobacter izolovaných od pacientů s cystickou fibrózou a stanovení jejich citlivosti k antibiotikům*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské mikrobiologie, 2012. s. Vedoucí bakalářské práce MVDr. Oto Melter, Ph.D.

## Anotace

Cystická fibróza (*mucoviscidosis*) je nevléčitelné geneticky podmíněné onemocnění, které je způsobeno mutacemi v genu CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene*). Mezi nejčastější příčiny zvýšené mortality a morbidity pacientů patří bakteriální infekce dýchacích cest, které mohou být způsobeny i méně častými patogeny.

Bakteriální druhy rodů *Ralstonia* a *Achromobacter* nejsou pro zdravého člověka patogenní, ale patří mezi patogeny prokázané ve sputu pacientů s CF. Avšak kvůli jejich fenotypové podobnosti s ostatními bakteriálními patogeny vyskytujícími se u pacientů s CF unikají pozornosti mikrobiologa.

Cílem práce bylo navržení metod pro identifikaci rodu *Ralstonia*, stanovení kvantitativní a kvalitativní citlivosti k antibiotikům a zpracování literární rešerše zaměřené na problematiku rodu *Achromobacter*.

Kmeny *Ralstonia* spp. byly identifikovány pomocí metod fenotypových a genotypových, byla stanovena jejich citlivost k antibiotikům a navržena originální metoda genotypové identifikace *R. respiraculi*.

## Klíčová slova

Cystická fibróza, *Ralstonia*, *Achromobacter*, antibiotika, genotyp, fenotyp

## **Annotation**

Cystic fibrosis (mucoviscidosis) is an incurable genetic disease caused by mutations in the CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene). The most common causes of increased mortality and morbidity of patients include bacterial respiratory infections which may occur even due to less frequent pathogens. Bacterial species of the *Ralstonia* and *Achromobacter* genera are not considered pathogenic for healthy people, but they have been established as pathogens in the sputum of patients with CF. However, due to their phenotypic similarity to other bacterial pathogens encountered in patients with CF, microbiologists often do not pay attention to them.

The aim of this thesis was to propose some methods of identification of the genus *Ralstonia*, to determine both quantitative and qualitative susceptibility towards antibiotics, and to make a bibliographical search focused on the issue of the *Achromobacter* genus.

Strains of *Ralstonia* spp. were identified using phenotypic and genotypic methods and were tested for the susceptibility towards antibiotics. The thesis also proposes a new method of genotypic identification of *R. respiraculi*.

## **Keywords**

Cystic fibrosis, *Ralstonia*, *Achromobacter*, antibiotics, genotype, phenotype

## **Prohlášení**

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

V Praze 23. 4. 2012

Alice Michálková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému vedoucímu práce MVDr. Oto Meltrovi Ph.D. za cenné rady, ochotu a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi Mgr. Janu Tkadlecovi za praktické rady při řešení experimentální části a odborné konzultace. V neposlední řadě děkuji všem pracovníkům Ústavu klinické mikrobiologie FN v Motole za jejich velmi ochotnou pomoc. Také děkuji své rodině za podporu během studia.

# Obsah

<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>9</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>1 CYSTICKÁ FIBRÓZA.....</b>	<b>11</b>
1.1 ONEMOCNĚNÍ A VÝSKYT.....	11
1.2 HISTORIE .....	11
1.3 PATOGENEZE .....	12
1.4 SYMPTOMY ONEMOCNĚNÍ.....	12
1.5 BAKTERIÁLNÍ PŮVODCI RESPIRAČNÍCH INFEKČÍ U CF.....	13
<b>2 ROD <i>RALSTONIA</i> .....</b>	<b>15</b>
2.1 PŮVOD A VÝSKYT.....	15
2.2 MORFOLOGIE A FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI.....	15
2.3 RŮSTOVÉ A KULTIVAČNÍ VLASTNOSTI .....	15
2.4 IDENTIFIKACE FENOTYPOVÁ A GENOTYPOVÁ.....	16
<b>3 ROD <i>ACHROMOBACTER</i> .....</b>	<b>18</b>
3.1 PŮVOD A VÝSKYT.....	18
3.2 MORFOLOGICKÉ A FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI .....	18
3.3 RŮSTOVÉ A KULTIVAČNÍ VLASTNOSTI .....	19
3.4 IDENTIFIKACE FENOTYPOVÁ A GENOTYPOVÁ.....	20
<b>4 CÍL .....</b>	<b>21</b>
<b>5 MATERIÁL.....</b>	<b>22</b>
5.1 REFERENČNÍ KMENY .....	22
5.2 KLINICKÉ IZOLÁTY.....	22
5.3 VZORKY SPUTA PACIENTŮ .....	22
5.4 KULTIVAČNÍ PŮDY .....	22
5.5 CHEMIKÁLIE A KOMERČNÍ SADY.....	23
5.6 ROZTOKY .....	23
5.6.1 Barvení podle Grama.....	23
5.7 ANTIBIOTIKA .....	23
5.7.1 Diskový difúzní test (DDT) .....	23
5.7.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) .....	24
5.8 MATERIÁL PRO PCR.....	24
5.8.1 Komerční sady .....	24
5.8.2 Primery .....	24
5.8.3 DNA standarty .....	25

5.9	ELEKTROFORÉZA .....	25
5.9.1	Gel pro elektroforézu.....	25
5.10	INTERNETOVÉ DATABÁZE A POČÍTAČOVÉ PROGRAMY .....	25
5.11	POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	26
<b>6</b>	<b>METODIKA.....</b>	<b>27</b>
6.1	ODBĚR SPUTA, TRANSPORT A MIKROSKOPIE .....	27
6.2	FENOTYPOVÁ IDENTIFIKACE REFERENČNÍHO KMENE <i>R. RESPIRACULI</i> .....	27
6.2.1	Kultivační průkaz <i>R. respiraculi</i> .....	27
6.2.2	Selektivní kultivační průkaz <i>R. respiraculi</i> .....	28
6.2.2.1	Selektivní kultivační průkaz <i>R. respiraculi</i> ve směsi s <i>P. aeruginosa</i> .....	28
6.2.2.2	Selektivní kultivační průkaz <i>R. respiraculi</i> ze sputa .....	29
6.2.3	MALDI-TOF/MS .....	30
6.3	GENOTYPOVÁ IDENTIFIKACE <i>R. RESPIRACULI</i> .....	32
6.3.1	Izolace DNA .....	32
6.3.2	Polymerázová řetězová reakce.....	33
6.3.3	Elektroforéza na agarózovém gelu .....	34
6.4	STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM.....	35
6.4.1	Diskový difúzní test.....	35
6.4.2	Mikrodiluční test – MIC .....	36
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>38</b>
7.1	FENOTYPOVÁ IDENTIFIKACE REFERENČNÍHO KMENE <i>R. RESPIRACULI</i> .....	38
7.1.1	Kultivační průkaz <i>R. respiraculi</i> .....	38
7.1.2	Biochemické vlastnosti a identifikace .....	39
7.1.3	Gramovo barvení.....	39
7.1.4	Selektivní průkaz <i>R. respiraculi</i> .....	40
7.1.4.1	Selektivní kultivační průkaz <i>R. respiraculi</i> ve směsi s <i>P. aeruginosa</i> .....	40
7.1.4.2	Selektivní kultivační průkaz <i>R. respiraculi</i> z patientského sputa.....	41
7.2	GENOTYPOVÁ IDENTIFIKACE .....	42
7.3	STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM.....	43
7.3.1	Diskový difúzní test – DDT .....	43
7.3.2	Diluční test – stanovení MIC .....	44
<b>8</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>46</b>
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>49</b>
	<b>REFERENČNÍ SEZNAM.....</b>	<b>50</b>



## SEZNAM ZKRATEK

ABPA – alergická bronchopulmonální aspergilóza

ATB – antibiotika

BCC – *Burkholderia cepacia* komplex

BCSA – *Burkholderia cepacia* selective agar

BHIA – *Brain heart infusion broth*

CF – cystická fibróza

CFU – *colony forming units*; přibližný počet bakterií v ml vzorku

CFTR – *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene*

DDT – difúzní diskový test

dNTP – deoxyribonukleotidtrifosfát

dsDNA – *double stranded DNA*

EDTA – etylendiaminotetraoctová kyselina

FISH – *fluorescence in situ hybridization*

HIB – *Horse blood agar*

HPLC – *High-performance liquid chromatography*

KA – krevní agar

MALDI-TOF/MS – *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*

MC – MacConkey agar

MH – Mueller-Hinton agar

MIC – minimální inhibiční koncentrace

PCR – polymerázová řetězová reakce

RISA – *ribosomal intergenic spacer analysis*

RL – *Respiratory Specimen Lysis Reagent*

RN – *Respiratory Specimen Neutralization Reagent*

rRNA – ribosomální RNA

RW – *Respiratory Specimen Wash Solution*

ssDNA – *single stranded DNA*

TSA – *Tryptic soy agar*

## ÚVOD

Cystická fibróza je autozomálně recesivní dědičné onemocnění, které je způsobeno mutacemi v genu CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene*). Mutace v genu CFTR způsobují poruchu chloridového kanálu, která je příčinou mnoha klinických projevů CF. Nejdůležitější a nejzávažnějším klinickým projevem jsou bakteriální infekce plic, které jsou příčinou zvýšené mortality a morbidity pacientů s CF. Bakteriální infekce u pacientů s CF jsou časté kvůli tvorbě vazkého hlenu a porušené mukociliární funkce. Pacienti s CF musí být kvůli bakteriálním infekcím léčeni pomocí antibiotik, ale časté používání antibiotických látek zvyšuje současně resistenci mikroorganismů k antibiotikům. Proto je nutné, kromě správné identifikace bakterie způsobující infekci, stanovit i její citlivost k antibiotikům.

Bakteriální druhy patřící do rodů *Ralstonia* a *Achromobacter* nejsou pro zdravého člověka patogenní, avšak u pacientů s cystickou fibrózou (CF), kteří jsou kvůli svému onemocnění vnímaví k infekci neobvyklými bakteriálními patogeny, mohou způsobovat infekce. Vzhledem k tomu, že jsou fenotypově podobné ostatním, nejčastěji se vyskytujícím patogenům u pacientů s CF, unikají pozornosti mikrobiologa. Pokud neprokážeme infekci vyvolanou rody *Ralstonia* a *Achromobacter*, nemůžeme pacienty cíleně léčit. Od roku 2009 do roku 2010 byly na Ústavu Klinické mikrobiologie v Motole prokázány klinické izoláty rodu *Achromobacter* u 8 pacientů s CF, rod *Ralstonia* nebyl prozatím prokázán u žádného z pacientů. Ve své práci se zabývám návrhem metod k prokázání přítomnosti těchto bakterií, odlišení od ostatních patogenů pacientů s CF a stanovením jejich citlivosti k antibiotikům.

# 1 Cystická fibróza

## 1.1 Onemocnění a výskyt

Cystická fibróza je autozomálně recesivní geneticky podmíněné onemocnění. Dalším názvem pro CF je *mucoviscidosis* (*mucus* – hlen, *viscidus* – vazký). Tento název vznikl ve snaze zdůraznit charakter hlenu v dýchacích cestách a někteří němečtí a francouzští autoři jej dodnes používají. V evropské populaci se CF vyskytuje jako nejčastější autozomálně recesivní onemocnění s přibližným výskytem jednoho postiženého dítěte na 2500-4500 novorozenců. V České republice je výskyt CF stejný jako u ostatních evropských populací, přibližně se počítá s narozením 33 dětí ročně [1].

Protože CF je autozomálně recesivní onemocnění, postižené dítě se narodí pouze v případě, že zdědí od každého z rodičů jeden mutovaný gen pro CF, oba rodiče jsou tedy zdraví přenašeči. Nosičství je v České republice poměrně časté, předpokládá se, že každý 26. jedinec je nosičem mutace pro CF. Z toho vyplývá, že v každém 676. manželství budou oba partneři přenašeči a mají tedy riziko 25 %, že se jim narodí dítě postižené CF [2].

## 1.2 Historie

Již v 17. století se v lidových písních vyskytovaly zmínky o tzv. začarovaných dětech, jejichž pot chutnal slaně a měly brzy zemřít. Slanou chuť potu si lidé vysvětlovali tím, že očarované děti se málo myjí a hodně potí. Popěvky a lidovými pověrami o začarovaných dětech se po mnoho let zblízka zabýval Dr. Busch z Rostocku. Profesor botaniky a anatomie z Leidenu, Pieter Pauw, jako první popsal patologicko-anatomické změny pankreatu u kachetické 11 leté dívky. Švýcarský pediatr Q. Fanconi v roce 1936 publikoval sdělení, ve kterém rozlišil změny u CF a celiakie, a zmínil se též o současné poruše pankreatu a bronchiektázii [1, 2].

V roce 1938 byl popsán americkou patoložkou Dorothy Andersenovou syndrom cystické fibrózy pankreatu. Jednalo se o první vědecký popis nemoci. Zkoumaná skupina dětí měla nízkou váhu, trpěla průjmy se silně páchnoucí stolicí a celkově neprosplávala. Označení CF pankreatu, bylo odvozeno z výskytu charakteristických histopatologických lézí, které byly nalezeny u zemřelých novorozenců. Ve své práci popisuje Andersenová jako základní problémy u CF (mimo pankreatické insuficience s podvýživou), také dýchací infekce [1, 3].

Velký význam pro historii CF měl objev potní anomálie. Tomu předcházela velká vedra, při kterých se některé děti trpící CF dostávaly do těžké dehydratace a oběhového šoku. Lékaři zjistili, že v potu nemocných je 5x více solí než u zdravého dítěte a proto dochází k tak velkým ztrátám solí pocením. Jednoduchá metoda navržená podle Gibsona a Cooka umožnila praktické uplatnění potní anomálie. Tato metoda byla založená na stimulaci potních žláz pilokarpinovou iontoforézou a následném stanovení solí v potu. V roce 1989 byl nalezen a popsán gen CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene*) odpovědný za projevy CF. Dnes je známo více než 1300 mutací tohoto genu. První pacient s CF byl v ČR diagnostikován v roce 1946 na II. dětské klinice. Do roku 1960 bylo v ČR diagnostikováno 30 pacientů s CF, ale po roce 1960, kdy se v ČR začal používat k diagnostice CF potní test, se počet pacientů každoročně zvýšil [1].

### 1.3 Patogeneze

Cystickou fibrózu způsobují mutace v genu CFTR, který je 205 kb dlouhý, obsahuje 27 exonů a je lokalizován na krátkém raménku sedmého chromozomu. Z velkého počtu popsanych mutací způsobující CF bylo jen 22 mutací identifikováno s frekvencí alespoň 0,1 %, ostatní mutace jsou velmi vzácné. První identifikovanou a nejběžnější mutací je delece 3 bp v pozici 508, tím dochází ke ztrátě fenylalaninu. Mutace byla označena jako F508del a vyskytuje se především u pacientů s těžkým onemocněním [3, 4].

Gen CFTR kóduje protein, který je důležitý pro transport chloridových iontů na apikální membráně epitelálních výsterek exokrinních žláz a jeho mutací dochází k poruše funkce chloridového kanálu. Poruchou chloridového kanálu dochází k abnormálnímu transportu chloridových a sodných iontů přes epitelální membránu a tím současně k poruše hydratace mukoidních sekretů dýchacích cest a vývodů pankreatu. Snížením hydratace hlenu se zvýší jeho viskozita a to usnadňuje kolonizaci a rozvoj bakteriální infekce dýchacího systému [1, 3, 5].

### 1.4 Symptomy onemocnění

Defekt v poruše přepravy iontů chloridovým kanálem je základem mnoha klinických projevů CF. Nejčastějším a nejzávažnějším projevem u CF je onemocnění

plíc. U pacientů s CF často nacházíme chronickou bronchiolitidu, bronchiektázií a chronický zánět plic s následnou fibrotizací tkáně. Těžké postižení plic spojené s destrukcí plicní tkáně vede k plicní hypertenzi a následuje rozvoj *cor pulmonale*. Kromě postižení plic dochází i k významnému postižení pankreatu, ale i jiných orgánů. Relativně častá je i nosní polypóza a chronická sinusitida.

K poškození pankreatu dochází neprůchodností pankreatických ductů, což zapříčiňuje vazký sekret. U novorozenců je typický mekoniový ileus doprovázený nafouknutím břicha, zvracením a pozdním odchodem mekonie. Se sníženou exkrecí enzymů pankreatu dochází k malabsorpci (zejména tuků), proto postižené děti celkově neprospívají. Se zvyšujícím se věkem a postupujícím poškozením pankreatu se u pacientů může objevit *diabetes mellitus*. Složení žluče je též patologické, dochází ke zvýšené viskozitě žluče a k obstrukcím žlučových cest. Obstrukce se klinicky projevuje bolestmi břicha. Žlučové kyseliny se mohou chovat hepatotoxicky a vyvolávat záněty jater. Postižení jater bývá třetí nejčastější příčinou úmrtí pacientů s CF. Velmi nebezpečné pro pacienty s CF je zvýšení teploty. Vzhledem k tomu, že jejich pot obsahuje vysoké koncentrace solí, mohou být pacienti ohroženi náhlým úmrtím z hyponatrémie a hypochlorémie. Mezi další obtíže patří i problémy s počítím. V děložním hrdle žen se může tvořit vazký hlen, který způsobuje problémy s oplodněním. Muži postižení CF jsou z 98 % neplodní. Neplodnost u mužů je způsobena obstruktivní azoospermií, tedy slepě zakončeným nadvarletem s chybějícím vývodem nadvarlete, což je způsobeno pravděpodobně ucpáním vývodů vazkým hlenem [2, 6, 7].

## 1.5 Bakteriální původci respiračních infekcí u CF

Bakteriální infekce dýchacích cest je nejčastější příčinou zvýšené mortality a morbidit pacientů s CF. Typickými patogeny vyskytujícími se u pacientů s CF jsou *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* a bakterie patřící do *Burkholderia cepacia komplexu* (BCC). Mezi méně často prokazované patogeny, které lze izolovat ze sputa pacientů, patří např.: *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, členové rodu *Enterobacteriaceae* a různé druhy rodů *Ralstonia* a *Pandoraea*. Některé druhy rodu *Burkholderia*, které nepatří do BCC, *B. gladioli*, a druhy z jiných rodů, jako je rod *Ralstonia* a *Pandoraea*, mají podobné fenotypové a genotypové vlastnosti jako bakterie z BCC. Průkaz těchto bakteriálních

druhů je problematický a údaje o výskytu a významu onemocnění schází. Velmi závažné komplikace může způsobit i inhalace spór plísně *Aspergillus fumigatus*, které vyvolávají alergickou bronchopulmonální aspergilózu (ABPA) [1, 6, 7, 8].

Přítomnost vazkého hlenu a snížená mukociliární funkce respiračního epitelu usnadňuje trvalou kolonizaci dýchacích cest a to vede k rozvoji chronické infekce. Většina pacientů s CF je do 18 let chronicky infikovaná bakterií *P. aeruginosa*. Trvalá antibiotická léčba je u pacientů s CF nutná, ale zároveň časté používání antibiotik způsobuje postupně zvyšující se resistenci mikroorganismů. V posledních dvaceti letech se objevují nově rezistentní bakteriální druhy rodů *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* nebo *Achromobacter* [9].

## 2 Rod *Ralstonia*

### 2.1 Původ a výskyt

Důvodem navržení rodu *Ralstonia* v roce 1995 byly špatně zařazené druhy rodů *Burkholderia* a *Alcaligenes*, *B. pickettii*, *B. solanacearum* a *Alcaligenes eutrophus*. Později byly do rodu *Ralstonia* zařazeny další druhy z jiných rodů: *R. basilensis*, *R. gilardii*, *R. paucula*, *R. oxalatica*, *R. campinensis*, *R. melitallidurans*, *R. manitolilytica*, *R. taiwanensis*, *R. insidiosa*, *R. respiraculi* a *R. syzygii*. K dnešnímu dni do rodu *Ralstonia* patří 14 druhů. Většina druhů se vyskytuje pouze u rostlin, v půdě a v odpadních vodách. Některé druhy, *R. gilardii*, *R. insidiosa*, *R. manitolilytica*, *R. paucula*, *R. pickettii*, *R. respiraculi* a *R. taiwanensis*, byly izolovány z klinického materiálu pacientů s CF [10, 11, 12].

### 2.2 Morfologie a fyziologické vlastnosti

Bakterie rodu *Ralstonia* jsou aerobní nefermentující tyčinky. Podle barvitelnosti dle Grama je řadíme mezi gramnegativní bakterie. Většina druhů rodu *Ralstonia*, kromě *R. solanacearum* a *R. syzygii*, je pohyblivá. Bičíky mají umístěny na konci buňky, polárně, nebo okolo celé buňky, tedy peritrichálně. Všechny druhy rodu *Ralstonia* jsou kataláza a oxidáza pozitivní. Redukce dusičnanů byla prokázána u *R. pickettii*, *R. taiwanensis*, *R. gilardii*, *R. melitallidurans*, *R. insidiosa*, *R. oxalatica* a *R. syzygii*. Některé druhy, např. *R. campinensis*, vykazují rezistenci k těžkým kovům. Produkci ureázy nacházíme u *R. pickettii*, *R. solanacearum*, *R. paucula*, *R. manitolilytica*, *R. insidiosa*, *R. campinensis*, *R. oxalatica* a *R. syzygii* [8, 11, 13, 14, 15, 16, 17].

### 2.3 Růstové a kultivační vlastnosti

Většina druhů rodu *Ralstonia* roste při teplotách 28-37 °C. *R. pickettii*, *R. eutrophus*, *R. gilardii*, *R. manitolilytica* a *R. campinensis* jsou schopny růst i při 41-42 °C, naproti tomu *R. oxalatica* a *R. syzygii* rostou pouze při 25-28 °C. Doba kultivace je různá, *R. syzygii* vyžaduje k růstu minimálně 7 dní, naproti tomu některé druhy rostou na tryptickém sójovém agaru (TSA) při 30 °C již po 24 hodinách, ostatní druhy potřebují pro růst minimálně 48 hodin. Většina druhů roste na běžné kultivační půdě, jako je krevní agar (KA), na Mueller–Hintonově agaru (MH), který je určený

pro stanovení citlivosti k antibiotikům diskovým difúzním testem (DDT), dále růst pozorujeme na selektivní Endově půdě a *R. insidiosa* roste na selektivní půdě pro *Burkholderia cepacia* (BCSA) [8, 13, 14, 17]. Výše popsané fyziologické, morfologické, kultivační, biochemické a další biochemické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Vlastnost/ test	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
Kataláza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidáza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureáza	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	v	+	v	x
Redukce dusičnanů	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
Bičíky	p	n	pe	pe	p	p	pe	p	p	p	p	p	pe	n
Asimilace:														
1. Citrát	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
2. N acylglukosamin	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	v	-
3. Phenylacetát	+	-	+	+	-	v	+	-	+	+	+	+	+	-
Růst při:														
1. 28 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. 30 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3. 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4. 41–42 °C	+	-	+	-	x	+	+	+	-	-	x	+	-	-

**Tabulka č. 1: Charakteristické vlastnosti druhů rodu *Ralstonia***

1. *R. picketti*; 2. *R. solanacearum*; 3. *R. eutrophus*; 4. *R. taiwanensis*; 5. *R. respiraculi*; 6. *R. gilardii*; 7. *R. paucula*; 8. *R. mannitolilytica*; 9. *R. melitallidurans*; 10. *R. basilensis*; 11. *R. insidiosa*; 12. *R. campinensis*; 13. *R. oxalatica*; 14. *R. syzygii*. Vysvětlivky ke zkratkám v tabulce: +, pozitivní reakce u >90 % testovaných kmenů; -, negativní reakce u >10 % testovaných kmenů; v, pozitivní reakce u 10-90 % testovaných kmenů; x, potřebné informace nejsou k dispozici; p, bičík umístěn polárně; pe, bičíky umístěné peritrichálně; n, nemá bičík. Vytvořeno podle publikovaných zdrojů [8, 11, 13, 14, 15, 16, 17].

## 2.4 Identifikace fenotypová a genotypová

Mezi nejvíce rozšířené metody identifikace patří testy fenotypové, ty mohou být ale málo specifické, proto se s rozvojem molekulárně genetických metod více využívají testy genotypové. Tyto metody jsou ale časově, finančně a technicky náročné. Snadnou, rychlou a specifickou metodou je identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie.



K identifikaci bakterií se používá metoda MALDI-TOF/MS (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*). Mezi fenotypové testy patří mikroskopie, kultivační průkaz, biochemické a fyziologické testy. Nejvýznamnější molekulárně genetickou metodou, která se používá nejen k identifikaci bakterií, je polymerázová řetězová reakce (PCR). Nejčastěji se amplifikuje specifická sekvence genu pro 16S rRNA (ribosomální RNA) [1, 18, 19, 20].

## 3 Rod *Achromobacter*

### 3.1 Původ a výskyt

*Achromobacter xylosoxidans* byl poprvé zařazen do rodu *Achromobacter* v roce 1971, v roce 1978 byl vyřazen ze seznamu platných jmen a v roce 1981 byl název znovu obnoven. O tři roky později byl *Achromobacter xylosoxidans* přesunut do rodu *Alcaligenes* a přejmenován na dva poddruhy: *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* a *Alcaligenes denitrificans* subsp. *denitrificans*. V roce 1986 byly názvy poddruhů označeny za neplatné, protože přívlastek *xylosoxidans* má přednost před přívlastkem *denitrificans*, a byly přejmenovány na *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* a *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans*. Na základě fenotypových a molekulárně genetických testů byl v roce 1989 navržen rod *Achromobacter* jako samostatný rod a byly do něj zařazeny *Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter ruhlandii* (dříve *Hydrogenomonas ruhlandii*), *Achromobacter piechandii* a *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*. Později byly do rodu *Achromobacter* zařazeny další druhy, v roce 2003 *Achromobacter spanius* a *Achromobacter insolitus* a v roce 2011 *Achromobacter marplatensis*. Druhy rodu *Achromobacter* se normálně vyskytují v půdě a ve vodě, ale byly izolovány i z různých patologických vzorků např.: z krve, z ran na nohou, míšního moku, moče, stolice, hnisu a ve stěrech z očí, uší a hltanu. Lambiasi *et al* se ve své studii zaměřili na výskyt *Achromobacter xylosoxidans* u pacientů s CF. Za období 4 let vyšetřili 300 pacientů s CF. Prokázali výskyt *Achromobacter xylosoxidans* u 17,6 % pacientů, z toho bylo 11,3 % pacientů s chronickou infekcí [21, 22, 23, 24].

### 3.2 Morfologické a fyziologické vlastnosti

Bakteriální druhy rodu *Achromobacter* patří mezi aerobní, nefermentující, nesporulující bakterie. Svým tvarem připomínají kokobacily až tyčinky. Podle Gramova barvení je řadíme mezi gramnegativní bakterie. Většina druhů jsou pohyblivé a bičičky mají umístěny peritrichálně. Všechny druhy rodu *Achromobacter* jsou kataláza a oxidáza pozitivní a všechny druhy asimilují adipát, malát a fenylacetát. Žádný z druhů nevykazuje produkci ureázy [22, 24, 25].

### 3.3 Růstové a kultivační vlastnosti

Minimální potřebná doba pro kultivaci je 24 hodin, ovšem až po 48 hodinách kultivace tvoří kolonie (2 mm), které lze použít pro identifikační a jiné testy. *Achromobacter* spp. roste dobře na MacConkeyho (MC) agaru, MC agaru s přídavkem NaCl, bujónu se základem-mozkosrdcové infúze (BHI) při 25-37 °C a na agaru s přídavkem koňské krve (HIB) při 42 °C. Kolonie jsou malé, ploché až mírně konvexní s hladkými okraji. Některé druhy produkují nevýrazný pigment, který je bílý, světle zelený až hnědý [22, 23, 24]. Výše popsané fyziologické, morfologické, kultivační a biochemické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Vlastnost/ test	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Kataláza	+	+	+	+	+	+
Oxidáza	+	+	+	+	+	+
Ureáza	-	-	-	-	-	-
Bičíky	pe	pe	pe	pe	nk	nk
Asimilace						
1. Glukóza	+	-	+	-	-	-
2. Xylosa	+	-	+	-	-	-
3. Carpát	+	+	+	-	x	-
4. Adipát	+	+	+	+	+	+
5. Malát	+	+	+	+	+	+
6. Phenylacetát	+	+	+	+	+	+
7. Aesulin	+	+	-	-	-	-
Růst						
1. BHI 25, 37 °C	+	+	+	+	+	+
2. HIB 42 °C	+	+	+	+	x	x
3. MC agar	+	+	+	+	x	x
3. MC agar s NaCl 3%, 5%	+	+	+	+	+	+

**Tabulka č. 2: Charakteristické vlastnosti druhů rodu *Achromobacter***

1. *A. xylosoxidans*; 2. *A. denitrificans*; 3. *A. ruhlandii*; 4. *A. piechandii*; 5. *A. insolitus*; 6. *A. spanius*.

Vysvětlivky ke zkratkám v tabulce: +, pozitivní reakce; -, negativní reakce; x, potřebné informace nejsou k dispozici; p, bičík umístěn polárně; pe, bičíky umístěné peritrichálně; nk, bičíky mají pouze některé kmny. Vytvořeno podle publikovaných zdrojů [21, 22, 23].

### 3.4 Identifikace fenotypová a genotypová

K fenotypové identifikaci *Achromobacter* spp. se používají mikroskopické metody, kultivační testy, biochemické a fyziologické testy. Ke genotypové identifikaci se používají metody molekulárně genetické. Nejčastěji se používá metoda PCR, nebo různé její modifikace, např.: RISA (*ribosomal intergenic spacer analysis*). Metoda RISA metoda využívá rozdílné délky intergenového spaceru (IGS) mezi geny pro 16S rRNA a 23S rRNA, IGS je amplifikován a separován na polyakrylamidovém gelu nebo pomocí HPLC (*High-performance liquid chromatography*). Další molekulárně genetickou metodou, kterou lze použít k identifikaci *Achromobacter* spp., je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) [26, 27, 28].

## **4 Cíl**

Cílem práce bylo zavedení nových metod kultivace, genotypových identifikačních metod, stanovení kvalitativní a kvantitativní citlivosti k antibiotikům sbírkového kmene z rodu *Ralstonia* a zpracování literární rešerše zaměřené na problematiku rodu *Achromobacter*.

## 5 Materiál

### 5.1 Referenční kmeny

Druh	Sbírka
<i>R. respiraculi</i>	BCCM/LMG 21510, Gent, Belgie
<i>R. insidiosa</i>	BCCM/ LMG 18101, Gent, Belgie
<i>R. mannitolilytica</i>	BCCM/ LMG 18103, Gent, Belgie,
<i>R. pickettii</i>	BCCM/ LMG 18088, Gent, Belgie

**Tabulka č. 3: Referenční kmeny rodu *Ralstonia***

Vysvětlivky: BCCM/LMG, Bacteria collection Univeriteit Gent – Laboratorium voor microbiologie.

### 5.2 Klinické izoláty

- Klinické izoláty použité pro selektivní kultivační průkaz *R. respiraculi*

Číslo	Bakterie	Materiál	Oddělení
334	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	sputum	PNA

**Tabulka č. 4: Klinické izoláty**

Vysvětlivky: PNA, Pneumologická ambulance.

### 5.3 Vzorky sputa pacientů

- Vzorky sputa použité pro selektivní kultivační průkaz *R. respiraculi*

Pacient	Prokázané patogeny		Materiál	Oddělení
A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	sputum	CCF, Motol
B	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	sputum	CCF, Motol

**Tabulka č. 5: Vzorky sputa**

Vysvětlivky: CCF, Centrum cystické fibrózy.

### 5.4 Kultivační půdy

- Mueller-Hinton agar – Oxoid, Velká Británie
- Sabouraudův agar s gentamicinem – Oxoid, Velká Británie
- Columbia krevní agar s 5 % beraní krve – Oxoid, Velká Británie
- Endo agar – Oxoid, Velká Británie
- Sabouraudův agar – Oxoid, Velká Británie

## 5.5 Chemikálie a Komerční sady

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

## 5.6 Roztoky

### 5.6.1 Barvení podle Grama

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

## 5.7 Antibiotika

### 5.7.1 Diskový difúzní test (DDT)

Antibiotika (ATB)	Obsah (µg)	Výrobce	Antibiotika (ATB)	Obsah (µg)	Výrobce
Colistin (CT)	10	Oxoid	Amikacin (AK)	30	Oxoid
Gentamicin (CN)	10	Oxoid	Ceftazidim (CAZ)	30	Oxoid
Netilmicin (NET)	30	Oxoid	Piperacili/Tazobactam (TZP)	110	Oxoid
Tobramycin (TOB)	10	Oxoid	Cefepim (FEP)	30	Oxoid
Ampicilin/Sulbactam (SAB)	20	Oxoid	Cefoperazon/Sulbactam (SCF)	105	Oxoid
Cotrimoxazol (SXT)	25	Oxoid	Imipenem (IPM)	10	Oxoid
Ofloxacin (OFX)	5	Oxoid	Meropenem (MEM)	30	Oxoid
Ciprofloxacin (CIP)	5	Oxoid	Tigecyklin (TGC)	15	Oxoid

**Tabulka č. 7: Antibiotika použitá pro DDT**

## 5.7.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

- sety pro stanovení MIC, Gramnegativy I. a II. řada – Trios, ČR

ATB – GI	Obsah od – do ( $\mu\text{g/ml}$ )	ATB – G1	Obsah od – do ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ampicilin (AMP)	0,5 – 64	Piperacilin (PIP)	1 – 128
Ampicilin/Sulbactam (SAB)	0,25 – 32	Piperacilin/Tazobactam (TZP)	0,5 – 64
Cefazolin (CZL)	1 – 128	Cefoperazon (CPR)	0,5 – 64
Cefuroxim (CRX)	0,5 – 64	Cefotaxim (CTX)	0,125 – 16
Cefoxitin (CXT)	0,5 – 64	Ceftazidim (CTZ)	0,25 – 32
Gentamicin (GEN)	0,25 – 32	Cefepim (CPM)	0,063 – 8
Cotrimoxazol (COT)	1 – 128	Cefoperazon/ Sulbactam (CPS)	0,25 – 32
Colistin (COL)	0,25 – 32	Meropenem (MEM)	0,25 – 32
Kys. Oxolinová (OXO)	0,5 – 64	Ciprofloxacín (CIP)	0,063 – 8
Ofloxacin (OFL)	0,125 – 16	Tigecyklin (TIG)	0,063 – 8
Tetracyklin (TET)	0,25 – 32	Tobramycin (TOB)	0,25 – 32
Aztreonam (AZT)	0,25 – 16	Amikacin (AK)	0,5 – 32

Tabulka č. 8: Antibiotika obsažená v setech pro stanovení MIC

## 5.8 Materiál pro PCR

### 5.8.1 Komerční sady

- PPP master mix – TOP BIO, ČR
- Amplicor RSP kit – Roche, Německo

### 5.8.2 Primery

Primery 1-4 byly vybrány na základě publikovaných informací [12]. Primery 5-6 pro průkaz *R. respiraculi* byly navrženy na základě sekvence strukturálního genu pro 16S rRNA pomocí softwaru ze serveru *National Center for Biotechnology*



*Information* na adrese <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY860248.1> a softwaru na adrese [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi).

Primer	Sekvence 5'-3'	T <sub>m</sub> (°C)
1. RalGS-F	CTGGGGTTCGATGACGGTA	58
2. RalGS-R	ATCTCTGCTTCGTTAGTGGC	58
3. Rres-F	GTCCGGAAAGAAATGGCG	62
4. Rres-R	TCCTTGCGGTTAGGCTACCC	62
5. Rr755	TGGTAGTCCACGCCCTAAAC	58
6. Rr959	AGTGGCATGTCAAGGGTAGG	58

**Tabulka č. 6: Použité primery v PCR reakci**

*Vysvětlivky: T<sub>m</sub>, melting point (bod tání).*

### 5.8.3 DNA standarty

- GeneRuler™ DNA Ladder Mix, SM0333, 100–10,000 bp – Fermentas

## 5.9 Elektroforéza

### 5.9.1 Gel pro elektroforézu

- TBE 0,5 x koncentrovaný
- Agarosa – Serva, Germany
- EtBr solution – Sigma, USA

Připravený agarózový gel byl 1%.

### 5.10 Internetové databáze a počítačové programy

- PubMed; US National Library of Medicine National Institutes of Health, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- Euzéby J.P.: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <http://www.bacterio.cict.fr>
- Software MALDI-TOF/MS analyzátoru – IVD MALDI Biotyper 2.2, Bruker Daltonics, USA

## 5.11 Použité přístroje

- Analytické váhy – EK 120 A, LAB-systém, ČR
- Centrifuga – Mini spin plus, Eppendorf AG, Německo
- Třepačka – Minishaker, IKA Works, Inc., USA
- MALDI-TOF/MS analyzátor – Bruker, Daltonics, USA
- Termocyklér – GenePro Thermal cycler, Bioer, USA
- Mikrovlnná trouba: Whirlpool M504, Whirlpool Corp., USA
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu: Consort E835, Dynex s.r.o., ČR
- Dokumentační systém pro elektroforézu: Kodak Gel Logic 120, Kodak, USA
- Autokláv – Getinge HS-4406, Getinge Group, ČR

## 6 Metodika

### 6.1 Odběr sputa, transport a mikroskopie

Sputum z dolních cest dýchacích se pro mikrobiologický rozbor odebírá ráno, nalačno. Pacient se snaží expektorovat co největší obsah sputa z dolních dýchacích cest a co nejméně jej kontaminovat při přechodu horními dýchacími cestami. Sputum vyplivne do sterilního plastového kontejneru. Sputum se transportuje při pokojové teplotě a mělo by být zpracováno do 2 hodin po odběru. Mikroskopie sputa podle Grama se provádí za účelem zjištění zastoupení buněčné (leukocyty, velké epitélie) nebo převažující bakteriální složky, podle kterého usuzujeme buď na kvalitní sputum převážně z dolních dýchacích cest (leukocyty) nebo na kontaminaci z horních cest dýchacích (velké epitélie). Mikroskopii sputa zde uvádím jen pro dokreslení postupu vyšetření sputa a v experimentální práci jsem ho neprováděla a nevyhodnocovala.

### 6.2 Fenotypová identifikace referenčního kmene *R. respiraculi*

Fenotypová identifikace referenčního kmene *R. respiraculi* byla provedena pomocí mikroskopie, kultivace, testování biochemických vlastností a hmotnostní spektrometrie. Pomocí imerzního objektivu jsem hodnotila preparát *R. respiraculi* obarvený podle Grama. Hodnotil se tvar bakterie a zařazení podle Grama. Pro srovnání s informacemi uváděnými v publikované literatuře o rodu *Ralstonia* jsem provedla mikroskopii obarvených preparátů podle Grama u *R. insidiosa*, *R. mannitolilytica* a *R. pickettii*. Z biochemických vlastností se u *R. respiraculi*, *R. insidiosa*, *R. mannitolilytica* a *R. pickettii* testovala cytochromoxidázová aktivita pomocí diagnostických proužků (ITEST, ČR) a katalázový test na produkci peroxidázy pomocí peroxidu vodíku (COOPHARMA s.r.o., ČR).

#### 6.2.1 Kultivační průkaz *R. respiraculi*

Referenční kmen *R. respiraculi* LMG 21510 byl naočkován pomocí sterilní kličky na MH agar a vložen do termostatu při teplotě 30 a 37 °C, jedna kultivační plotna byla ponechána při laboratorní teplotě 22 °C. Po 24 a 48 hodinách se hodnotil růst a morfologie kolonií. Dále se testoval růst na Sabouraudově agaru s gentamicinem, Columbia krevním agaru s přidavkem 5 % beraní krve a Endově agaru při 37 °C po 24

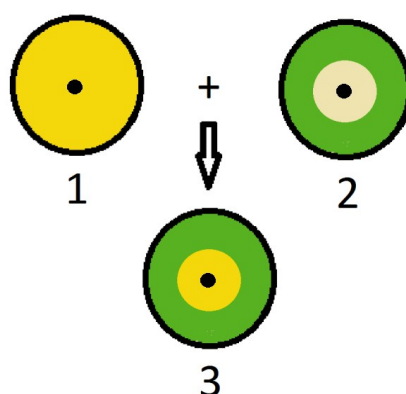
a 48 hodinách. Dále byly pro porovnání růstu s *R. respiraculi* kultivovány *R. insidiosa*, *R. mannitolilytica* a *R. pickettii* na MH agaru při 37 °C. Bakteriální růst se hodnotil po 24 a 48 hodinách kultivace.

## 6.2.2 Selektivní kultivační průkaz *R. respiraculi*

Cílem selektivní kultivace bylo prokázat *R. respiraculi* i v přítomnosti *Pseudomonas aeruginosa*, která mimořádně často kolonizuje a infikuje pacienty s CF a její růstové vlastnosti ji favorizují při kultivaci před pomaleji rostoucími ralstoniemi.

### 6.2.2.1 Selektivní kultivační průkaz *R. respiraculi* ve směsi s *P. aeruginosa*

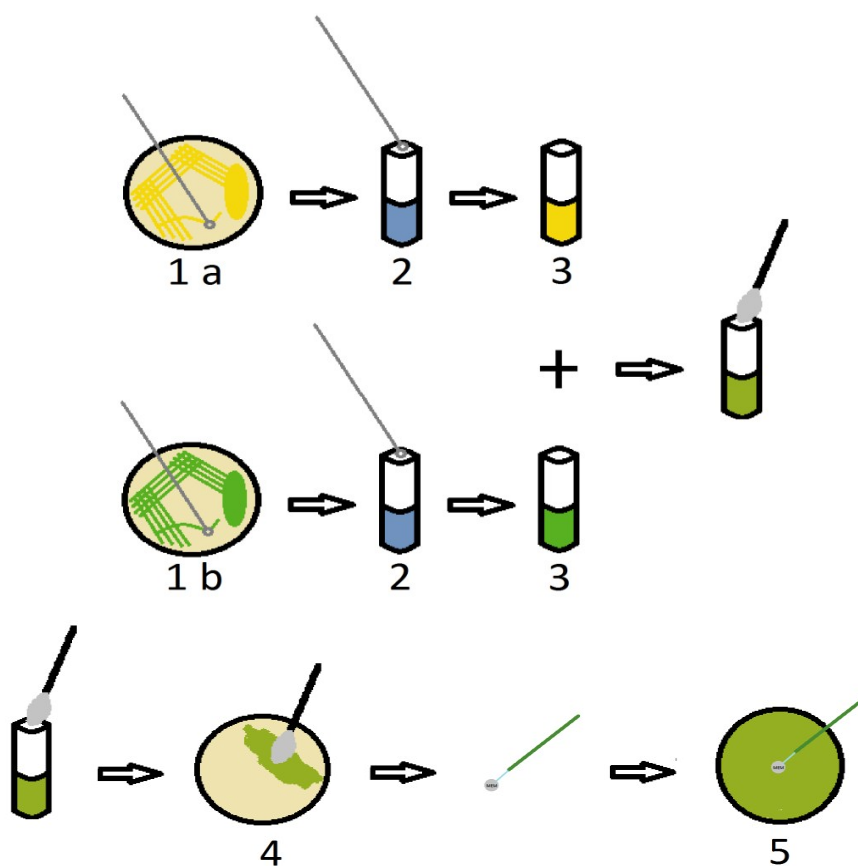
Pro selektivního kultivační průkaz *R. respiraculi* ve směsi s *P. aeruginosa* se využilo rozdílných citlivostí bakterií k antibiotikům. Použitý kmen 334 jako většina kmenů *P. aeruginosa* je citlivá k meropenemu a v jeho okolí se vytvoří inhibiční zóna. Testovaný kmen BCCM/LMG 21510 *R. respiraculi* je k meropenemu resistantní a proto roste i v blízkém okolí meropenemu. Při návržení selektivní kultivace s pomocí meropenemu jsem vycházela z výsledků testování referenčních kmenů všech druhů, které jsem měla k dispozici (BCCM/LMG 18101 *R. insidiosa*, BCCM/LMG 18103 *R. mannitolilytica*, BCCM/LMG 18088 *R. pickettii*). Kromě *R. insidiosa* byly všechny kmeny resistantní k meropenemu. Principem metody, který je znázorněn na obrázku č. 1, je průkaz *R. respiraculi* v inhibiční zóně meropenemu ve směsi s *P. aeruginosa*



**Obrázek č. 1: Princip selektivního průkazu *R. respiraculi***

1. růst *R. respiraculi* s meropenemem; 2. růst *P. aeruginosa* s meropenemem; 3. růst *R. respiraculi* v inhibiční zóně meropenemu.

Z čisté bakteriální kultury referenčního kmene *R. respiraculi* se ve fyziologickém roztoku připravilo inokulum, které odpovídalo 0,5 stupni podle zákalového standardu McFarlanda ( $10^8$  CFU/ml). Stejným postupem se připravilo inokulum z bakteriální kultury *P. aeruginosa*. Obě suspenze se ve stejném poměru (0,5 ml) smíchaly a byly v několika různých směrech rozetřeny na MH agar pomocí sterilního vatového tampónu. Pomocí jehly se na plotnu umístil antibiotický disk meropenemu a plotna byla umístěna do termostatu při 37 °C. Po 24hodinách se odečetly výsledky a provedla se izolace a identifikace bakterií z okolí inhibiční zóny pomocí MALDI-TOF/MS. Postup metody je zobrazen na obrázku č. 2.



**Obrázek č. 1: Postup selektivního průkazu *R. respiraculi***

1 a. *R. respiraculi*; 1. b *P. aeruginosa*; 2. vytvoření inokul; 3. smíchání inokul; 4. očkování na MH agar; 5. aplikace meropenemu.

#### 6.2.2.2 Selektivní kultivační průkaz *R. respiraculi* ze sputa

Selektivní kultivační průkaz *R. respiraculi* z patientského sputa je založen na resistenci *R. respiraculi* k meropenemu. Zatímco většina patogenů je k meropenemu citlivá, *R. respiraculi* by kvůli své resistenci měla být izolována z inhibiční zóny

antibiotika. Pro průkaz byly použity patientské vzorky sputa A, B a jejich kombinace. Vzorky sputa byly homogenizovány a smíchány se standardním inokulem ( $10^8$  CFU/ml) *R. respiraculi* ve fyziologickém roztoku (0,5 stupně McFarlanda). Vzniklá směs byla očkovaná na kultivační plotny v několika směrech pomocí sterilního vatového tampónu. Pomocí jehly byl na naočkovanou plotnu nanesen antibiotický disk meropenemu. Plotny byly umístěny do termostatu při 37 °C a po 24 a 48 hodinách se odečetly výsledky. Bakterie z okolí meropenemu byly izolovány na MH agar a identifikovány pomocí metody MALDI-TOF/MS.

Test se prováděl na několika kultivačních médiích: MH agar a Sabouraudův agar s gentamicinem. Protože růst *R. respiraculi* byl na Sabouraudově agaru s gentamicinem velmi slabý, byly pro selektivní kultivační průkaz připraveny plotny obsahující pouze Sabouraudova agar bez přísad antibiotik. Tyto plotny byly připraveny rozpuštěním 0,65 g Sabouraudova agaru ve 100ml destilované vody. Rozpuštěný agar byl ve varném skle přenesen do autoklávu, kde byl sterilizován. Po 2 hodinách se hotový Sabouraudův agar přelil do sterilních Petriho misek a nechal se do druhého dne ztuhnout. Plotny byly po ztuhnutí označeny a uschovány před použitím do lednice při teplotě 4 °C.

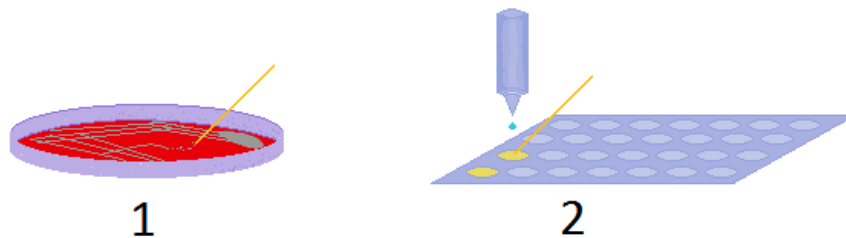
### 6.2.3 MALDI-TOF/MS

Hmotnostní spektrometrie dříve umožňovala detekci jen látek s nízkou molekulární hmotností, avšak upravením podmínek ionizace laserem (přenos energie trvá v řádech nanosekund a energie laseru je rovna energii potřebné k vybuzení dané molekuly), lze detekovat i látky s vyšší molekulární hmotností.

Metoda MALDI-TOF/MS se využívá ke stanovení molekulární hmotnosti látek pomocí ionizace laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu. Pomocí metody MALDI-TOF/MS lze rychle identifikovat bakteriální rody i druhy. Na pevný nosič je nanesen vzorek bakteriální kolonie s matricí a ta je pak zasažena nanosekundovým pulzem laseru. Po rozkladu matrice, ke které dochází absorpcí energie pulzu, jsou molekuly vzorku ionizovány. K ionizaci dochází adicí kationtu nebo aniontu na molekuly vzorku, vznikem radikálu odštěpením elektronu, disociací vodíkových kationtů z molekuly vzorku nebo fragmentizací molekuly vzorku s jejich následným spojením. Elektrické pole urychlí ionty vzorku a ty pak procházejí uzemněnou mřížkou do vakua v trubici detektoru letu. Ionty vzorku se v detektoru pohybují rychlostí, která

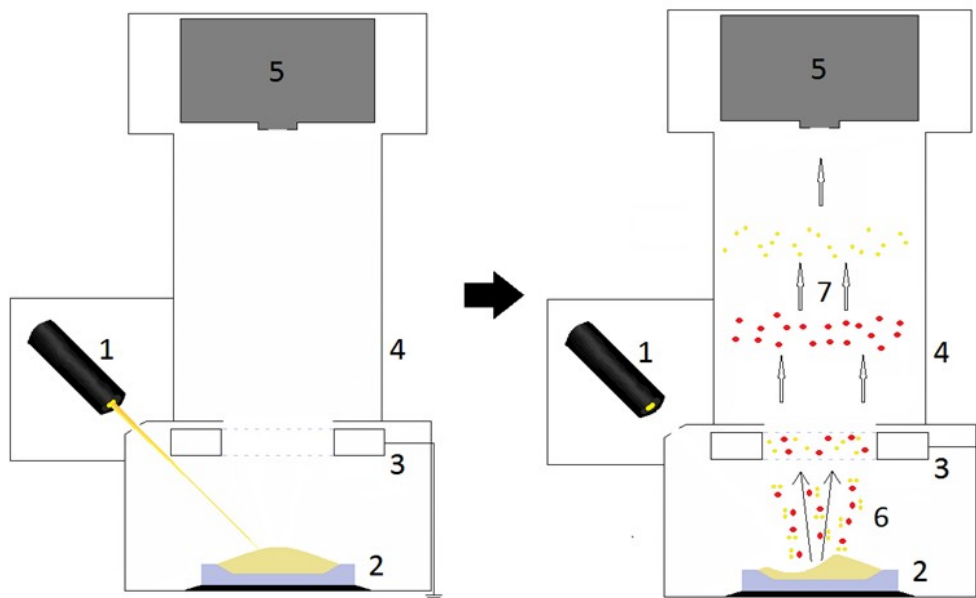
je daná jejich hmotností a nábojem. Podle doby letu částice se vypočte poměr molekulové hmotnosti a náboje částic [30].

Získané hmotnosti iontů se porovnávají pomocí počítačového programu s hmotností iontů, které byly získány stejným způsobem ze vzorku o známém složení. Výsledek je vyjádřen skórem, které pro správnou identifikaci musí překračovat určitou hranici spolehlivosti. Tato hranice spolehlivosti se liší podle použitého algoritmu a databáze sekvencí [31]. Postup nanášení vzorků na pevný nosič (kovová destička) je znázorněn na obrázku č. 3. Princip metody MALDI-TOF/MS je zobrazen na obrázku č. 4.



**Obrázek č. 3: Postup přípravy vzorků pro metodu MALDI-TOF/MS**

*1. Odběr bakteriální kolonie z kultury narostlé na kultivační půdě; 2. Nanesení bakteriální kolonie na pevný nosič s následným nanesením matrice.*



**Obrázek č. 4: Princip metody MALDI-TOF/MS**

*1. laser; 2. vyšetřovaný vzorek nanesený na kovové destičce; 3. uzemněná mřížka s elektrickým polem; 4. trubice detektoru doby letu s vakuem; 5. detektor doby letu, 6. ionizované molekuly vzorku (červené) a matrice (žluté), 7. rozdělení urychlených částic podle rychlosti (čím větší částice, tím pomalejší let).*

### 6.3 Genotypová identifikace *R. respiraculi*

Pro identifikaci bakterií se dříve využívaly pouze metody fenotypové. I přes mnohá schémata a počítačové systémy napomáhajícími vyšetřovanou bakterii správně druhově zařadit se může identifikace bakterií v různých laboratořích lišit, hlavně z důvodu výskytu atypických vlastností nebo z důvodu značné subjektivity při odečtu barevných reakcí při biochemické identifikaci. S rozvojem molekulární genetiky se začala používat genotypová identifikace. Pro identifikaci bakterií a stanovení jejich fylogenetických vztahů se hledal specifický úsek v genomu bakterií. K těmto účelům se využívá porovnání specifických úseků genů kódující 5S, 16S a 23S rRNA. Dnes se nejvíce používá gen kódující 16S rRNA. Tento gen lze použít k porovnání všech bakterií, ale také k porovnání s genem kódujícím 16S rRNA Archeí nebo genem kódujícím 18S rRNA eukaryot. Tento konzervovaný gen je dostatečně dlouhý (přibližně 1550 bp) a obsahuje dostatek mezidruhových polymorfismů pro zařazení bakterií do rodů, druhů i poddruhů [32].

#### 6.3.1 Izolace DNA

Izolace DNA je prvním krokem před její analýzou. Nejdříve se bakteriální buňky lýzují v extrakčním pufru, který kromě detergentů obsahuje také EDTA (etylendiaminotetraoctová kyselina). Tato kyselina vyváže přebytečné  $\text{Ca}^{2+}$  a brání tak štěpení nukleových kyselin. Po lýze buněk následuje samotná izolace DNA, která se provádí fenol/chloroformovou extrakcí nebo metodou využívající adsorpci nukleových kyselin na silikátový povrch. V současnosti se pro izolaci DNA používají izolační soupravy [33].

Pro izolaci DNA *R. respiraculi* byl použit extrakční kit *Amplicor Respiratory Specimen Preparation kit* (Roche, Německo), který pro izolaci využívá následující reagenty:

- *Respiratory Specimen Wash Sol* (RW)
- *Respiratory Specimen Lysis Reagent* (RL)
- *Respiratory Specimen Neutralization Reagent* (RN)

Izolace DNA byla provedena z bakteriální biomasy *R. respiraculi* narostlé při 37 °C. Pomocí sterilní kličky byla biomasa (1 µl) resuspendována ve 100 µl



destilované vody v mikrokumavce a promíchána na vortexu. Ke vzorku bylo přidáno 500  $\mu$ l roztoku RW. K promytí bakteriálních buněk došlo po promíchání na vortexu, centrifugování (10 minut, 13000 otáček) a odstranění supernatantu. DNA se adherovala na stěně mikrokumavky. Do mikrokumavky s adherovanou DNA bylo přidáno 100  $\mu$ l lyzačního roztoku RL a po promíchání, byl vzorek temperován na 60 °C v termobloku, kde bakteriální buňky lýzovaly. K vytemperované krátce zcentrifugované směsi bylo přidáno 100  $\mu$ l neutralizačního roztoku RN, který neutralizoval účinky lýzujícího roztoku. DNA byla skladována při -20 °C.

### 6.3.2 Polymerázová řetězová reakce

PCR je nejčastěji používanou molekulárně genetickou metodou. Metoda PCR se používá k amplifikaci specifických úseků DNA. Každá PCR reakce se skládá z několika na sebe navazujících cyklů (15-40) cyklů, jeden cyklus se pak skládá ze 3 kroků: denaturace, *annealing* a *elongace*. Při denaturaci dochází k rozdělení vodíkových můstků dvouvláknové DNA (dsDNA) a vzniká jednovláknová DNA (ssDNA). Na ssDNA se připojují primery (*annealing*) a pomocí *Taq*-polymerázy jsou k primerům připojovány nukleotidy a tím je řetězec prodlužován (*elongace*). K amplifikaci je zapotřebí dvou primerů, jedná se o krátké úseky DNA o známé sekvenci, které nejsou delší než 50 nukleotidů. Primery musí být specifické pouze k oblasti, kterou chceme amplifikovat. Vzhledem k vysokým teplotám, které jsou použity v průběhu reakce, je nutné použít termostabilní polymerázy, která zůstane aktivní i při zahřátí ke 100 °C. Pro tyto účely se využívá *Taq*-DNA-polymeráza, která je izolována z termofilní bakterie objevené v horkých vřídlech Yellowstonského národního parku. Kromě primerů a polymerázy je pro provedení PCR zapotřebí vhodného pufru a volných deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP), které se budou připojovat k primerům a prodlužovat řetězec [33].

Genotypová identifikace referenčního kmene *R. respiraculi* byla provedena amplifikací specifických úseků genu kódujícího 16S rRNA. Jako první byla provedena optimalizace PCR metody pro určení optimální teploty amplifikace. Použité primery a jejich teploty tání ( $T_m$ ) jsou uvedeny v tabulce č. 5. Jako standard byl použit GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). Negativní kontrola obsahovala pouze naředěný PPP master mix (TOP BIO, ČR), který obsahuje všechny potřebné složky pro provedení PCR metody (2,5 mM  $MgCl_2$ , dNTPs každý 200  $\mu$ M, 2,5U *Taq*-Purple

DNA polymerázy, 75mM Tris-HCl, 0,01% Tween 20, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, stabilizátory a aditiva). Pro provedení PCR reakce byl použit termocyklér (BIOER, China). Celkem bylo provedeno 30 cyklů PCR reakce. První denaturace DNA trvala 8minut při teplotě 94 °C, následující denaturace trvaly 30 sekund při 94 °C, teplota *annealingu* byla zvolena pro jednotlivé primery (viz tabulku č. 5) a každá trvala 30 sekund, teplota *elongace* (syntézy) byla 72 °C/1 minutu, poslední *elongace* (syntéza) trvala 5 minut při 72 °C, po skončení posledního cyklu následovala fáze chlazení (10 °C). Po amplifikaci specifických úseků byla provedena elektroforéza na agarózovém gelu.

### 6.3.3 Elektroforéza na agarózovém gelu

Pro separaci DNA pomocí elektroforézy na agarózovém gelu se využívá záporně nabitých fosfátových skupin nukleových kyselin, které putují od katody k anodě. Rychlost pohybu molekuly DNA v agarózovém gelu se označuje jako elektroforetická pohyblivost. Porovnáním elektroforetické pohyblivosti fragmentu o neznámé délce (vyšetřovaný vzorek) proti elektroforetické pohyblivosti DNA standardu o známé délce, můžeme určit délku zjišťovaného fragmentu [34].

Agarózový gel byl připraven rozpuštěním 0,3g agarózy (Serva, Germany) ve 30 ml TBE pufru. Po krátkém povaření v mikrovlnné troubě se pro obarvení fragmentů DNA do gelu přidaly 2μl EtBr (Sigma, USA). Takto připravený gel byl nalit do plastového rámečku pro ztuhnutí gelu s místem pro připevnění hřebínku, který vytvoří jamky pro aplikaci vzorků. Po ztuhnutí byl gel umístěn do elektroforetické vaničky s pufrům a do vytvořených jamek byly napipetovány vzorky. Elektroforéza trvala přibližně 20 minut při 100V, po skončení separace byla DNA detekovatelná pomocí UV záření. Délka fragmentu použitého standardu byla 100-10000 bp. Použité primery pro rodovou a druhovou identifikaci *R. respiraculi* jsou uvedeny v tabulce č. 9.

Název	Délka fragmentů	Identifikace
RalGS-F, RalGS-R	546 bp	Rodu <i>Ralstonia</i>
Rres-F, Rres-R	1011 bp	Druhu <i>R. respiraculi</i>
Rr755, Rr959	204 bp	Druhu <i>R. respiraculi</i>

**Tabulka č. 9: Primery použité pro PCR reakci**

## 6.4 Stanovení citlivosti k antibiotikům

Pro úspěšnou antibiotickou terapii bakteriální infekce je nutné znát nejen původce onemocnění, ale i citlivost mikroba k antibiotikům. K určení citlivosti mikroorganismů *in vitro* se používají testy kvantitativní a kvalitativní. Pomocí kvalitativních testů určíme, ke kterému antibiotiku je daný mikroorganismus citlivý nebo resistantní, a kvantitativními testy zjistíme koncentraci antibiotika potřebnou k inhibici růstu nebo eliminaci mikroba.

### 6.4.1 Diskový difúzní test

Diskový difúzní test (DDT) je nejpoužívanější metodou pro kvalitativní stanovení citlivosti k antibiotikům. Metoda je jednoduchá a k jejímu provedení nejsou potřeba žádné speciální přístroje. Principem metody je difúze antibiotik z antibiotických disků do agarů s naočkovaným bakteriálním inokulem za vytvoření koncentračního spádu antibiotika. V okolí difundovaného antibiotika vzniká inhibiční zóna antibiotik, podle průměru inhibičních zón hodnotíme výsledky citlivosti bakterií. Výsledek DDT závisí na výběru vhodného kultivačního média a antibiotik, správné přípravě bakteriálního inokula a rozočkování na plotnu, dodržení podmínek pro kladení disků a přesném odečítání inhibičních zón. Standardním médiem používaným pro DDT je MH agar a jeho výška by měla být 4mm (měří se 2mm od okraje). Bakteriální inokulum, které je připraveno z čisté bakteriální kultury, musí odpovídat stupni 0,5 zákalového standardu podle McFarlanda ( $10^8$  CFU/ml), nižší nebo vyšší koncentrace vedou k chybnému stanovení citlivosti k antibiotikům. Inokulum očkujeme na MH agar do 15 minut pomocí sterilního vatového tampónu v několika směrech. Antibiotika by měla být na MH agar kladena celou plochou a neměla by se z povrchu agarů přesouvat nebo odstraňovat, protože difúze antibiotik do agarů nastává v okamžik přiložení antibiotického disku k povrchu agarů. Vzdálenost mezi antibiotickými disky a okrajem mísky by neměla být menší než 25 mm. Rychlé kladení antibiotických disků umožňují dispenzory, které jsou schopny aplikovat 6 antibiotických disků najednou. Plotny s antibiotickými disky se umísťují do termostatu při 37 °C dnem vzhůru, aby se zabránilo znehodnocení výsledků kondenzovanou vodou. Po 24 hodinách inkubace se průměry vytvořených zón inhibice měří pomocí posuvného pravítka a průměry se porovnávají s referenčními hodnotami pro jednotlivá antibiotika [29].

Bakteriální inokulum bylo připraveno podle výše zmíněných podmínek a sterilním vatovým tampónem bylo naočkováno na MH agar. Pomocí dispenzoru byly

na naočkované plotny aplikovány antibiotické disky pro stanovení citlivosti k antibiotikům *P. aeruginosa* (řady PS I – III). Naočkované plotny s antibiotickými disky byly umístěny do termostatů při 37 °C a po 24 a 48 hodinách byli odečteny výsledky. Referenční hodnoty pro antibiotika použita k určení citlivých kmenů *R. respiraculi* jsou uvedeny v tabulce č. 10.

ATB	IZ (mm)	ATB	IZ (mm)
Colistin (CT)	10	Amikacin (AK)	17
Gentamicin (CN)	15	Ceftazidim (CAZ)	18
Netilmicin (NET)	15	Piperacili/Tazobactam (TZP)	21
Tobramycin (TOB)	15	Cefepim (FEP)	18
Ampicilin/Sulbactam (SAB)	15	Cefoperazon/Sulbactam (SCF)	21
Cotrimoxazol (SXT)	16	Imipenem (IPM)	16
Ofloxacin (OFX)	16	Meropenem (MEM)	16
Ciprofloxacin (CIP)	21	Tigecyklin (TGC)	19

**Tabulka č. 10: Referenční hodnoty inhibičních zón jednotlivých antibiotik pro citlivé kmeny podle standardních metod CLSI (<http://www.clsi.org>, předtím NCCLS)**

*Vysvětlivky: IZ, inhibiční zóna.*

#### 6.4.2 Mikrodiluční test – MIC

Mikrodiluční metoda slouží ke kvantitativnímu stanovení citlivosti k antibiotikům a s její pomocí lze určit minimální inhibiční koncentraci (MIC) antibiotik. Minimální inhibiční koncentrace je nejnižší koncentrace antibiotika, která zastaví (inhibuje) viditelný růst vyšetřované bakterie. Metoda se provádí v jamkách mikrotitrační destičky a umožňuje určit MIC dvanácti antibiotik najednou. Jednotlivá antibiotika jsou v destičce obsažena v Mueller-Hinton bujónu a ve svislých sloupcích destičky jsou nařaděna geometrickou řadou s postupně zvyšující se koncentrací. Pro provedení testu je nutné vytvořit standardní inokulum z čerstvé bakteriální kultury, které se pomocí vícekanálové pipety nebo replikátoru očkuje do destičky. Po naočkování se destička umísťuje do termostatu při 37 °C a po uplynutí inkubační doby se odečítá výsledek

testu. Bakteriální růst v jamce se projeví zákalem nebo sedimentem na dně jamky. Koncentrace antibiotika v první jamce bez zákalu se odečítá jako MIC [35].

Pro stanovení MIC byly použity komerčně vyráběné destičky pro gramnegativní bakterie I. a II. řady (Trios, ČR). Před použitím se sety nechaly rozmrazit a vytemperovat na laboratorní teplotu. Inokulum bylo vytvořeno z čisté bakteriální kultury *R. respiraculi* a odpovídalo stupni 0,5 podle zákalového standardy McFarlanda. V poměru 1:10 bylo inokulum naředěno fyziologickým roztokem a pomocí replikátoru bylo očkováno do mikrotitračních destiček. Po 24 hodinách inkubace v termostatu při 37 °C byly odečteny výsledky a porovnány s referenčními hodnotami pro určení citlivosti. Referenční hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 11.

ATB – GI	Referenční hodnoty	ATB – GII	Referenční hodnoty
Ampicilin (AMP)	4,000 – 4,001	Piperacilin (PIP)	16,000 – 16,001
Ampicilin/Sulbactam (SAB)	8.000 – 8.001	Piperacilin/Tazobactam (TZP)	16,000 – 16,001
Cefazolin (CZL)	4.000 – 4,001	Cefoperazon (CPR)	8.000 – 8.001
Cefuroxim (CRX)	4,000 – 4,001	Cefotaxim (CTX)	4,000 – 4,001
Cefoxitin (CXT)	4.000 – 4,001	Ceftazidim (CTZ)	4.000 – 4,001
Gentamicin (GEN)	4.000 – 4,001	Cefepim (CPM)	4.000 – 4,001
Cotrimoxazol (COT)	4.000 – 4,001	Cefoperazon/ Sulbactam (CPS)	8.000 – 8.001
Colistin (COL)	32.000 – 32.001	Meropenem (MEM)	4.000 – 4,001
Kys. Oxolinová (OXO)	4.000 – 4,001	Ciprofloxacin (CIP)	1,000 – 1,001
Ofloxacin (OFL)	8.000 – 8.001	Tigecyklin (TIG)	1,000 – 1,001
Tetracyklin (TET)	2.000 – 2.001	Tobramycin (TOB)	4.000 – 4,001
Aztreonam (AZT)	8.000 – 8.001	Amikacin (AK)	8.000 – 8.001

**Tabulka č. 11: Referenční hodnoty pro určení minimální inhibiční koncentrace (MIC)**

## 7 Výsledky

### 7.1 Fenotypová identifikace referenčního kmene *R. respiraculi*

#### 7.1.1 Kultivační průkaz *R. respiraculi*

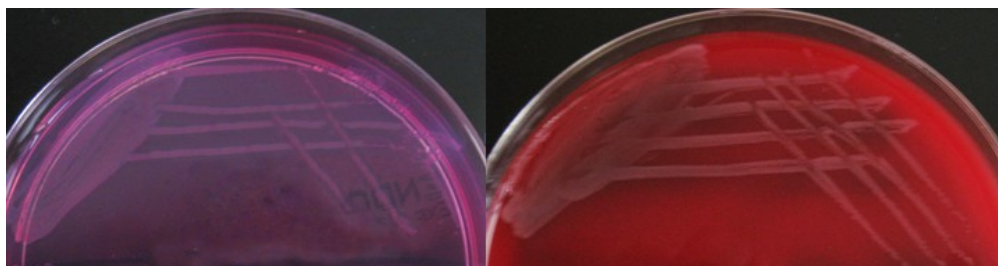
Referenční kmen *R. respiraculi* byl kultivován při 22 °C, 30 °C a 37 °C na MH agaru. Po 24 hodinách byl jeho růst na MH agaru slabý, ale po 48 hodinách byly již bakteriální kolonie dobře viditelné. Při porovnání teplot kultivace je zřejmé, že bakterie je schopna růst při teplotě 24-37 °C. Porovnání růstu při různých teplotách kultivace dokumentuje obrázek č. 5.



**Obrázek č. 5: Porovnání růstu *R. respiraculi* na MH agaru při různých teplotách**

1. kultivace *R. respiraculi* při 22 °C; 2. kultivace *R. respiraculi* při 30 °C; 3. kultivace *R. respiraculi* při 37 °C.

Morfologicky jsou kolonie lesklé, s hladkým rovnoměrným okrajem, šedobílé, a jejich konzistence je mazlavá. Velikost kolonií závisí na teplotě kultivace. Zatímco při 22 °C jsou kolonie spíše drobné, po kultivaci při 37 °C jsou kolonie velké a dobře viditelné. *R. respiraculi* roste na Endově půdě a krevním agaru v drobných špatně viditelných koloniích, avšak po 48 hodinách jsou kolonie lépe rozpoznatelné (obrázek č. 6). Růst na Sabouraudově agaru s gentamicinem po 24 hodinách při 37 °C byl velmi slabý a kolonie nebyly téměř viditelné, po 48 hodinách je růst bakterie lépe viditelný.



**Obrázek č. 6: *R. respiraculi* na Endově půdě (vlevo) a krevním agaru (vpravo) po 48 hodinách**

Bakteriální růst druhů *R. insidiosa*, *R. mannitolilytica* a *R. pickettii* byl na MH agaru pozitivní, po 24 hodinách kultivace byly kolonie drobné, zato po 48 hodinách kultivace dobře viditelné. Ostatní druhy tedy vyžadují stejné kultivační podmínky jako *R. respiraculi*. Ze zjištěných výsledků je patrné, že optimální podmínky pro kultivaci *R. respiraculi* jsou: kultivace na MH agaru při 37 °C po dobu 48 hodin.

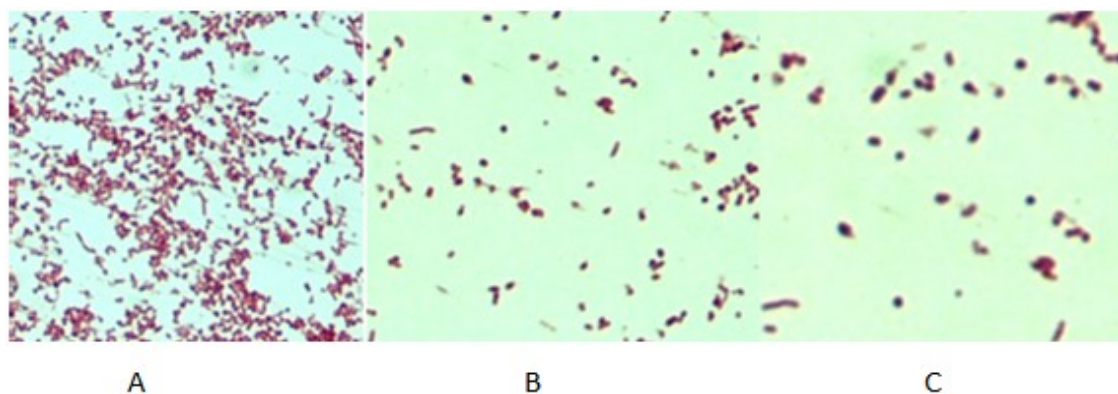
### 7.1.2 Biochemické vlastnosti a identifikace

Z biochemických vlastností se hodnotil katalázový a oxidázový test u *R. respiraculi*. Pro srovnání výsledků testů uváděných v literatuře byl oxidázový a katalázový test hodnocen i u *R. insidiosa*, *R. mannitolilytica* a *R. pickettii*. U všech druhů rodu *Ralstonia* byla kataláza i oxidáza pozitivní.

Všechna výsledná skóre vyhodnocená pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/MS při identifikaci *R. respiraculi* dosahovala skóre 2.200, které je výrobcem deklarováno pro spolehlivou druhovou identifikaci. Bakterie *R. respiraculi* byla identifikována jako *Cupriavidus respiraculi*, jedná se o jeden z basonymů pro *R. respiraculi*.

### 7.1.3 Gramovo barvení

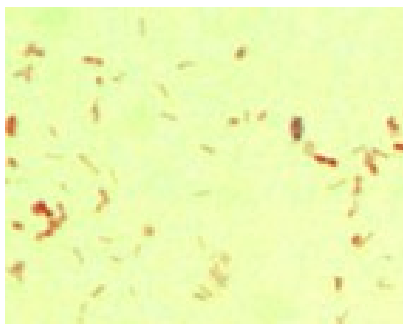
Mikroskopie *R. respiraculi* obarvené pomocí Gramova barvení prokázala, že *R. respiraculi* je gramnegativní. Tvarem připomíná tyčinky a je schopná tvořit dlouhá vlákna. Mikroskopie obarveného preparátu je na obrázku č. 7.



**Obrázek č. 7: Mikroskopie kultury *R. respiraculi* preparátu barveného podle Grama**

*A. drobné gramnegativní tyčinky; B. C. detail.*

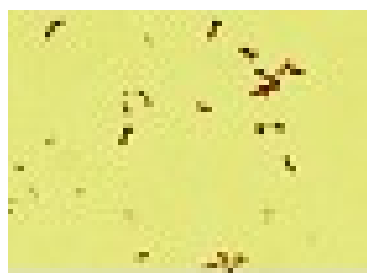
Barvením podle Grama bylo prokázáno, že i ostatní kmeny z rodu *Ralstonia*, *R. insidiosa*, *R. mannitolilytica* a *R. pickettii*, jsou gramnegativní tyčinky (jak uvádí literatura). Mikroskopie obarvených preparátů *R. insidiosa*, *R. mannitolilytica* a *R. pickettii* je na obrázcích č. 8–10.



**Obrázek č. 8: Mikroskopie kultury *R. insidiosa* preparátu barveného podle Grama**



**Obrázek č. 9: Mikroskopie kultury *R. mannitolilytica* preparátu barveného podle Grama**



**Obrázek č. 10: Mikroskopie kultury *R. pickettii* preparátu barveného podle Grama**

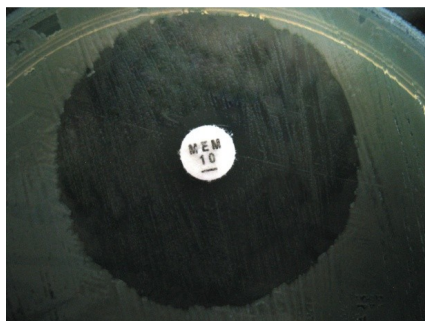
#### **7.1.4 Selektivní průkaz *R. respiraculi***

##### **7.1.4.1 Selektivní kultivační průkaz *R. respiraculi* ve směsi s *P. aeruginosa***

Plotny byly inokulovány bakteriální směsí *R. respiraculi* a *P. aeruginosa*. Po naočkování byl na plotny umístěn antibiotický disk meropenemu. V inhibiční zóně



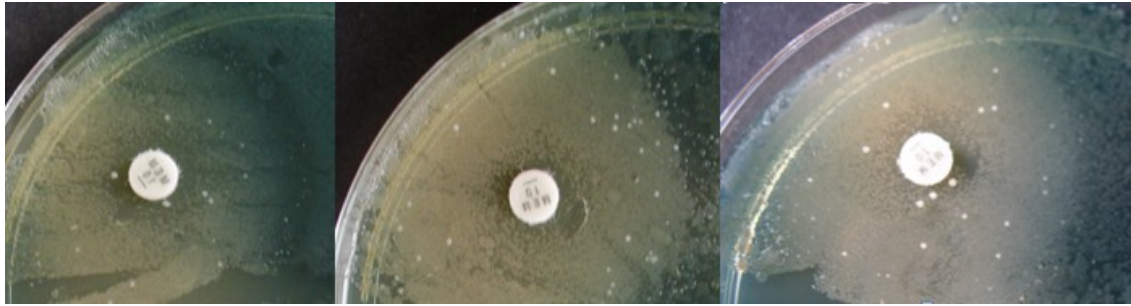
meropenemu byl po 24 hodinách kultivace viditelný bakteriální růst (viz obrázek č. 11). Pomocí identifikace metodou MALDI-TOF/MS se prokázala přítomnost *R. respiraculi*. Z okolí meropenemu se provedla izolace na MH agar, aby se zjistilo, jestli v jeho okolí nerostou i jiné bakteriální rody. Po 48 hodinách kultivace při 37 °C bylo z izolací patrné, že v okolí meropenemu roste pouze jeden bakteriální kmen, který byl fenotypově identifikován jako *R. respiraculi*.



**Obrázek č. 11: Selektivní kultivační průkaz *R. respiraculi* ve směsi s *P. aeruginosa***  
Na obrázku lze vidět bakteriální růst v inhibiční zóně meropenemu.

#### **7.1.4.2 Selektivní kultivační průkaz *R. respiraculi* z patientského sputa**

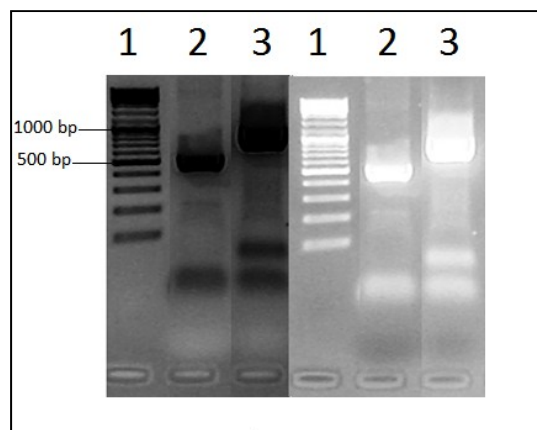
Plotny byly inokulovány bakteriální směsí *R. respiraculi* a patientského sputa. Po naočkování byl na plotny umístěn antibiotický disk meropenemu. U selektivního průkazu *R. respiraculi* z patientského sputa byla na kultivační plotně po 24 hodinách kultivace při 37 °C viditelná zóna inhibice meropenemu a v něm byl rozpoznatelný růst dvou patogenů. Byla provedena izolace obou druhů kolonií a po 48 hodinách inkubace při 37 °C se provedla fenotypová identifikace izolátů pomocí metody MALDI-TOF/MS. Izoláty, které rostly v inhibiční zóně, byly identifikovány jako *R. respiraculi* a *Candida albicans*. Test byl provedený na připraveném Sabouraudově agarů a komerčně vyráběném Sabouraudově agarů s gentamicinem. Růst na Sabouraudově agarů s gentamicinem nebyl po 24 hodinách kultivace viditelný, po 48 hodinách kultivace bylo v okolí meropenemu viditelných několik drobných špatně pozorovatelných kolonií. Růst bakterií na Sabouraudově agarů bez přídavku antibiotik byl špatně viditelný i po 48 hodinách kultivace. Z použitých kultivačních médií je pro selektivní kultivační průkaz nejvhodnější MH agar. Ostatní kultivační média jsou kvůli dlouhé době kultivace pro průkaz nevhodná. Selektivní kultivační průkaz *R. respiraculi* z patientského sputa na MH agarů je znázorněn na obrázku č. 12.



**Obrázek č. 12: Selektivní kultivační průkaz *R. respiraculi* z pacientského sputa**  
*Vlevo, pacientské sputum A s *R. respiraculi*; uprostřed, pacientské sputum B s *R. respiraculi*; vpravo, pacientské sputum A a B s *R. respiraculi*.*

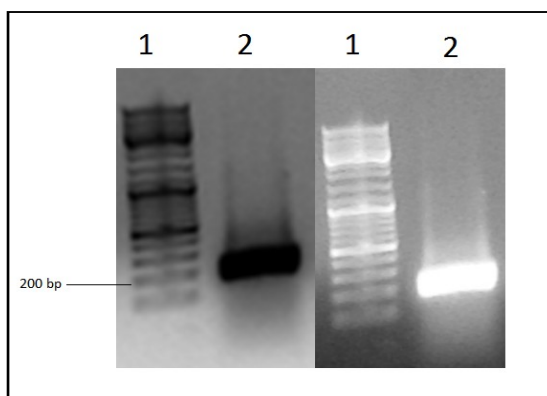
## 7.2 Genotypová identifikace

Genotypová identifikace druhu *R. respiraculi* byla provedena pomocí amplifikace genu 16S rRNA. Pro určení rodu *Ralstonia* byly použity primery RalGS-F a RalGS-R. Druhové určení *R. respiraculi* bylo provedeno pomocí primerů Rres-F, Rres-R a Rr755, Rr959. Po amplifikaci fragmentů genu pro 16S rRNA specifických pro *R. respiraculi* byla provedena elektroforéza s následným obarvením etidium bromidem a detekcí pod UV zářením. Výsledky amplifikace po provedení elektroforézy jsou na obrázcích č. 13 a 14.



**Obrázek č. 13: Genotypová identifikace *R. respiraculi* amplifikací genu 16S rRNA pomocí primerů RalGS-F, RalGS-R a Rres-F, Rres-R získaných na základě publikovaných informací [12]**

*1. standard; 2. ampikon o velikosti 546 bp, použité primery pro určení rodu *Ralstonia* (RalGS-F, RalGS-R); 3. ampikon o velikosti 1011 bp, použité primery pro druhové určení *R. respiraculi* (Rres-F, Rres-R).*



**Obrázek č. 14: Genotypová identifikace *R. respiraculi* amplifikací genu 16S rRNA pomocí originálně navržených primerů Rr755, Rr959**

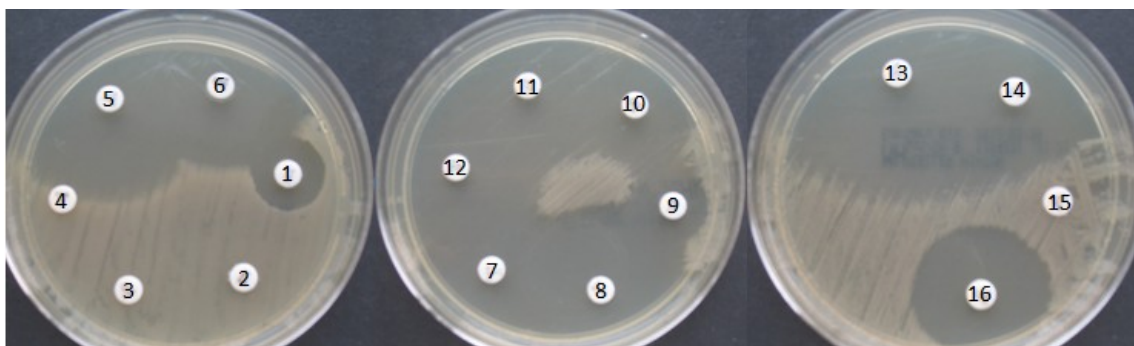
1. standard; 2. amplicon o velikosti 204 bp, použité primery pro druhovou identifikaci *R. respiraculi* (Rr755, Rr959).

Amplifikací genu 16S rRNA byla potvrzena rodová i druhová identifikace *R. respiraculi*.

### 7.3 Stanovení citlivosti k antibiotikům

#### 7.3.1 Diskový difúzní test – DDT

Diskový difúzní test byl hodnocen po 24 a 48 hodinách. Průměry inhibičních zón antibiotik byly měřeny pomocí posuvného měřítka a vyhodnocovány podle referenčních hodnot (tabulka č. 9). Sbírkový kmen *R. respiraculi* je rezistentní ke gentamicinu, tobramycinu, netilmicinu, amikacinu a meropenemu. Výsledky testu jsou zobrazeny na obrázku č. 15 a hodnoty citlivosti v tabulce č. 12.



**Obrázek č. 15: DDT *R. respiraculi***

1. colistin; 2. gentamicin; 3. netilmicin; 4. tobramycin; 5. ampicilin/sulbactam; 6. cotrimoxazol;  
7. ofloxacin; 8. ciprofloxacin; 9. amikacin; 10. ceftazidim; 11. piperacilin/tazobactam; 12. cefepim;  
13. cefoperazon/sulbactam; 14. imipenem; 15. meropenem; 16. tigecyklin.

Zkratky ATB	IZ (mm) po 24 hod	IZ (mm) po 48 hod	Výsledky po 24 hod	Výsledky po 48 hod
1. Colistin (CT)	18	18	C	C
2. Gentamicin (CN)	6	6	R	R
3. Netilmicin (NET)	6	6	R	R
4. Tobramycin (TOB)	6	6	R	R
5. Ampicilin/Sulbactam (SAB)	38	38	C	C
6. Cotrimoxazol (SXT)	30	30	C	C
7. Ofloxacin (OFX)	28	28	C	C
8. Ciprofloxacin (CIP)	30	28	C	C
9. Amikacin (AK)	6	12	C	R
10. Ceftazidim (CAZ)	23	23	C	C
11. Piperacili/Tazobactam (TZP)	31	31	C	C
12. Cefepim (FEP)	32	32	C	C
13. Cefoperazon/Sulbactam (SCF)	34	34	C	C
14. Imipenem (IPM)	30	30	C	C
15. Meropenem (MEM)	6	6	R	R
16. Tigecyklin (TGC)	24	24	C	C

**Tabulka č. 12: Výsledky DDT**

*R, resistantní; C, citlivé.*

### 7.3.2 Diluční test – stanovení MIC

Odečtení hodnot minimální inhibiční koncentrace probíhalo po 24 a 48 hodinách pomocí zvětšovacího zrcadla. Jako minimální inhibiční koncentrace antibiotika se hodnotila koncentrace v první jamce, kde nebyl viditelný bakteriální růst, tedy v první jamce bez zákalu. Odečtené hodnoty se porovnály s referenčními hodnotami (tabulka č. 10) a určila se citlivost k antibiotikům (tabulka č. 13 a 14). Stanovením MIC bylo prokázáno, že *R. respiraculi* je resistantní k ampicilinu, cefazolinu, cefuroximu, tetracyklinu, aztreonamu, ceftazidimu, meropenemu, tobramycinu a amikacinu. Hodnoty citlivosti k antibiotikům byly porovnány s výsledky DDT. Citlivost *R. respiraculi* stanovením MIC se kromě ceftazidimu shodovala s výsledky citlivosti DDT.

GI	24 hod	48 hod	Hranice Citlivosti	Výsledky po 24 hod	Výsledky po 48 hod
Ampicilin (AMP)	16	>64	4,000 – 4,001	R	R
Ampicilin/Sulbactam (SAB)	0.5	0,5	8.000 – 8.001	C	C
Cefazolin (CZL)	>64	>64	4.000 – 4,001	R	R
Cefuroxim (CRX)	8	8	4,000 – 4,001	R	R
Cefoxitin (CXT)	4	4	4.000 – 4,001	C	C
Gentamicin (GEN)	>32	>32	4.000 – 4,001	R	R
Cotrimoxazol (COT)	1	1	4.000 – 4,001	C	C
Colistin (COL)	0,25	0,25	32.000 – 32.001	C	C
Kys. Oxolinová (OXO)	8	4	4.000 – 4,001	R	C
Ofloxacin (OFL)	0,125	0.125	8.000 – 8.001	C	C
Tetracyklin (TET)	2	4	2.000 – 2.001	C	R
Aztreonam (AZT)	16	16	8.000 – 8.001	R	R

**Tabulka č. 13: Minimální inhibiční koncentrace antibiotik, GI řada**

*R, resistantní; C, citlivé.*

GII	24 hod	48 hod	Hranice Citlivosti	Výsledky po 24hod	Výsledky po 48 hod
Piperacilin (PIP)	>128	>128	16,000 – 16,001	C	C
Piperacilin/Tazobactam (TZP)	1	1	16,000 – 16,001	C	C
Cefoperazon (CPR)	4	4	8.000 – 8.001	C	C
Cefotaxim (CTX)	0,063	0,063	4,000 – 4,001	C	C
Ceftazidim (CTZ)	8	8	4.000 – 4,001	R	R
Cefepim (CPM)	0,5	0,5	4.000 – 4,001	C	C
Cefoperazon/ Sulbactam (CPS)	0,5	0,5	8.000 – 8.001	C	C
Meropenem (MEM)	>32	>32	4.000 – 4,001	R	R
Ciprofloxacin (CIP)	0,125	0,125	1,000 – 1,001	C	C
Tigecyklin (TIG)	0,125	0,125	1,000 – 1,001	C	C
Tobramycin (TOB)	>32	>32	4.000 – 4,001	R	R
Amikacin (AK)	32	32	8.000 – 8.001	R	R

**Tabulka č. 14: Minimální inhibiční koncentrace antibiotik, GII řada**

*R, resistantní; C, citlivé.*

## 8 Diskuze

Studie byla zaměřena na navržení selektivních kultivačních metod pro odlišení růstu *R. respiraculi* od ostatních bakteriálních patogenů vyskytujících se u pacientů s CF a identifikace *R. respiraculi*. Identifikace *R. respiraculi* byla provedena pomocí fenotypových a genotypových metod. Kvantitativní a kvalitativní citlivost k ATB byla u referenčního kmene *R. respiraculi* BCCM/LMG 21510 stanovena pomocí standardizovaných metod.

Pomocí kultivace *R. respiraculi* na různých kultivačních médiích při různých teplotách a po různé době kultivace byly určeny optimální podmínky kultivace. Potřebná doba kultivace *R. respiraculi* závisí na použitých kultivačních médiích a teplotě kultivace. Optimální teplota růstu *R. respiraculi* je 37 °C, ale bakterie je schopná růst v teplotním rozmezí 22-37 °C. Avšak při 22 °C a 30 °C jsou bakteriální kolonie po 24 hodinách kultivace drobné, proto je výhodné dobu kultivace prodloužit na 48 hodin. Pro viditelný růst *R. respiraculi* je potřeba tedy poměrně dlouhé doby kultivace, což může být problémem při její identifikaci, protože její drobné kolonie mohou být přehlédnuty při odečítání bakteriologického nálezu. Kultivační médium, které se během mé práce osvědčilo pro dobře viditelný růst *R. respiraculi*, byl MH agar. Bakterie rostla i na ostatních médiích (Sabouraudův agar s gentamicinem, Endův agar, krevní agar), ale její růst byl špatně pozorovatelný i po 48 hodinách kultivace. Růst *R. respiraculi* je tedy nejlépe pozorovatelný po 48 hodinách kultivace při 37 °C na Mueller-Hintonově agaru. Ostatní druhy rodu *Ralstonia*, *R. insidiosa*, *R. mannitolilytica* a *R. pickettii*, vyžadují ke kultivaci stejné podmínky jako *R. respiraculi*. Morfologie kolonií je prakticky stejná jako u *R. respiraculi*, proto je pro druhovou klasifikaci nutné použít další metody identifikace, např.: MALDI-TOF/MS nebo molekulárně biologické metody. Kolonie bakterií rodu *Ralstonia* jsou fenotypově podobné a lehce zaměnitelné rovněž s řadou druhů, které patří do skupiny gramnegativních nefermentujících tyčinek.

Mikroskopie podle Grama prokázala zařazení druhu *R. respiraculi* ke gramnegativním bakteriím. Tvarem připomíná *R. respiraculi* drobné tyčinky, která mohou tvořit vlákna. Pro srovnání s informacemi uváděnými v literatuře o rodu *Ralstonia* byla provedena mikroskopie podle Grama druhů *R. insidiosa*, *R. mannitolilytica* a *R. pickettii*. Pozorováním se potvrdilo, že všechny tyto druhy *ralstonií* patří ke gramnegativním tyčinkám. Mikroskopickým průkazem lze

*R. respiraculi* zařadit pouze mezi gramnegativní tyčinky, ale od jiných gramnegativních tyčinek ji nerozpoznáme, proto je nutné k jejímu odlišení použít jednu nebo více z uvedených metod.

Biochemické vlastnosti byly hodnoceny u *R. respiraculi*, *R. mannitolilytica*, *R. insidiosa* a *R. pickettii*. Hodnotila se cytochromoxidázová aktivita a tvorba peroxidázy, u všech byly výsledky pozitivní a shodovaly se s hodnotami uváděnými v literatuře.

Selektivním kultivačním průkazem *R. respiraculi* ze směsi s *P. aeruginosa* na Mueller-Hintonově agaru s využitím antibiotika meropenemu se podařilo odlišit růst *R. respiraculi* od *P. aeruginosa*. Tento selektivní kultivační průkaz s využitím meropenemu byl aplikován na přímý průkaz *R. respiraculi* ze sputa. Pro průkaz bylo využito několik kultivačních médií, nejlepších výsledků bylo ovšem dosaženo s použitím MH agaru. V inhibiční zóně meropenemu při průkazu *R. respiraculi* z patientského sputa byly izolovány dvě různé kolonie. Tyto kolonie byly identifikovány jako *R. respiraculi* a *C. albicans*. Vzhledem k tomu, že *C. albicans* je druh kvasinky, nelze proto její růst na kultivační plotně pomocí antibiotik inhibovat. Selektivní kultivační průkaz *R. respiraculi* ze sputa pacienta byl tedy pozitivní a bylo by ho možné využít ještě k přípravě diagnostického kultivačního média s obsahem meropenemu.

Pro fenotypovou identifikaci *R. respiraculi* byla použita metoda MALDI-TOF/MS. Pomocí metody MALDI-TOF/MS bylo identifikováno několik izolátů bakteriálních kolonií z okolí meropenemu u selektivního kultivačního průkazu jako *Cupriavidus respiraculi*. Jak již bylo uvedeno výše, jedná se o jeden z basonymů *R. respiraculi*, tedy původní platně zveřejněné jméno.

Genotypová identifikace bakteriálního druhu *R. respiraculi* byla provedena amplifikací specifických úseků genu kódující 16S rRNA. Pro amplifikaci bylo využito metody PCR. Primery pro rodovou identifikaci rodu *Ralstonia* použité v metodě PCR byly vybrány podle publikovaných informací. Pro druhové určení *R. respiraculi* byly použité primery vybrány podle publikovaných informací a primery originálně navržené na základě sekvence strukturálního genu pro 16S rRNA pomocí specializovaného softwaru (viz kapitola 5.9.2). Amplifikací specifických úseků pomocí takto získaných primerů byla potvrzena rodová i druhová identifikace *R. respiraculi*.

Kvalitativní určení citlivosti k antibiotikům metodou DDT ukázalo, že *R. respiraculi* je resistantní na gentamicin, tobramycin, netilmicin, amikacin

a meropenem. Pomocí kvantitativního stanovení citlivosti k antibiotikům metodou MIC byla po porovnání s výsledky metody DDT potvrzena rezistence *R. respiraculi* na amikacin, meropenem a tobramycin. Výsledky testů kvantitativního a kvalitativního stanovení citlivosti k antibiotikům se lišily v citlivosti *R. respiraculi* k ceftazidimu, metodou DDT byla *R. respiraculi* stanovena jako citlivá na ceftazidim, zatímco metodou MIC byla stanovena jako resistantní k ceftazidimu. Metodou MIC byla dále prokázána rezistence *R. respiraculi* k ampicilinu, cefazolinu, cefuroximu, tetracyklinu a aztreonamu. Jelikož byla citlivost k antibiotikům stanovena pouze u sbírkového kmene *R. respiraculi* BCCM/LMG 21510, nelze tuto citlivost tohoto kmene zobecnit pro jiné kmeny *R. respiraculi*.

Pro správnou identifikaci bakteriálního druhu *R. respiraculi* mezi ostatními bakteriemi vyskytujícími se u pacientů s CF je mikroskopie a hodnocení biochemických vlastností nedostačující. Z metod fenotypových lze použít selektivní kultivační průkaz k odlišení *R. respiraculi* ze sputa pacientů, avšak rychlejší a poměrně citlivější metodou pro průkaz ralstonií je hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/MS. Pomocí metod genotypových se identifikace sbírkového kmene *R. respiraculi* BCCM/LMG 21510 podařila.

V teoretické části bakalářské práce byla zpracována literární rešerše zaměřená na problematiku rodu *Achromobacter* izolovaného od pacientů s CF. Byly popsány fyziologické a biochemické vlastnosti rodu *Achromobacter* a kultivační a růstové vlastnosti rodu. Mezi identifikační metody rodu *Achromobacter*, které byly popsány ve stručném přehledu na základě zjištěných poznatků z publikované literatury, patří metody fenotypové a genotypové. Z fenotypových metod lze k identifikaci použít různé biochemické testy nebo mikroskopický a kultivační průkaz. Metody genotypové jsou pro správnou identifikaci rodu *Achromobacter* spolehlivější. Nejčastěji se používá metoda PCR s detekcí genu pro 16S rRNA.



## ZÁVĚR

*Ralstonia respiraculi* nebyla dosud prokázána ve vzorcích z dýchacích cest pacientů s CF dispenzarizovaných nebo léčených v rámci největšího centralizovaného centra pro cystickou fibrózou v ČR (Centrum pro cystickou fibrózou ve FN Motol). Pomocí navržené selektivní kultivační metody je možné *R. respiraculi* kultivovat i ze vzorků, které obsahují jiného bakteriálního původce nebo komenzální bakterie, kterým je nejčastěji *P. aeruginosa*. Kromě poměrně spolehlivé identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie je možné využít rovněž vysoce specifické a senzitivní genotypové metody amplifikace genu pro 16S rRNA se známými (publikovanými) nebo mnou navrženými primery. Amplifikaci specifické DNA tohoto bakteriálního původce je možné provádět i přímo ze vzorku sputa a tak zkrátit dobu průkazu a zvýšit senzitivitu záchytu. Citlivost k antibiotikům lze u tohoto druhu provádět pomocí standardizovaných kvalitativních a kvantitativních metod. V teoretické části práce byla zpracována literární rešerše zaměřená na problematiku rodu *Achromobacter*.

## REFERENČNÍ SEZNAM

1. VÁVROVÁ, Věra et al. *Cystická fibróza*. 1. Praha: Grada Publishing, 2006. 516 s. ISBN 80247-0531-1.
2. VÁVROVÁ, Věra et al. *Cystická fibróza: příručka pro nemocné a jejich rodiče*. 2., dopl. vyd. Praha: Professional Publishing, 2009, 165 s. ISBN 978-80-7431-000-3.
3. GILLIGAN, Peter H. *Microbiology of Airway Disease in Patients with Cystic Fibrosis*. *Clinical microbiology reviews*. 1991, roč. 4, č. 1, s. 31-35. ISSN 0893-8512. DOI: 10.1128/CMR.4.1.35.
4. GIBSON, Ronald L. et al. *Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003, roč. 168, č. 8, s. 918-951. ISSN 1073-449X. DOI: 10.1164/rccm.200304-505SO.
5. DÖRING, Gerd and GULBINS, Erich. *Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease*. *Cellular Microbiology*. 2009, roč. 11, č. 2, s. 208-216. ISSN 14625814. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2008.01271.x.
6. LYCZAK, Jeffrey B., CANNON, Carolyn L. and PIER, Gerald B. *Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis*. *Clinical microbiology reviews*. 2002, roč. 15, č. 2, s. 194-222. ISSN 0893-8512. DOI: 10.1128/CMR.15.2.194-222.2002.
7. JAKUBEC, Petr. *Cystická fibróza*. *Interní medicína pro praxi*. 2006, 8-I, č. 5, s. 235-239. ISSN 1212-7299.
8. COENYE, Tom, VANDAMME, Peter, and LIPUMA, John J. *Ralstonia respiraculi sp. nov., isolated from the respiratory tract of cystic fibrosis patients*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2003-09-01, roč. 53, č. 5, s. 1339-1342. ISSN 1466-5026. DOI: 10.1099/ij.s.0.02440-0.

9. ZHANG, Lijuan et al. *Antimicrobial Peptide Therapeutics for Cystic Fibrosis. Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005, roč. 49, č. 7, 2921–2927. ISSN 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.49.7.2921-2927.2005.
10. BOSCH, Alejandra et al. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Rapid Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria Isolated from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients. Journal of Clinical Microbiology*. 2008-08-04, roč. 46, č. 8, s. 2535-2546. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.02267-07.
11. COENYE, Tom et al. *Classification of Ralstonia pickettii-like isolates from the environment and clinical samples as Ralstonia insidiosa sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2003-07-01, roč. 53, č. 4, s. 1075-1080. ISSN 1466-5026. DOI: 10.1099/ij.s.0.02555-0.
12. COENYE, Tom et al. *Use of PCR Analyses To Define the Distribution of Ralstonia Species Recovered from Patients with Cystic Fibrosis. Journal of clinical microbiology*. 2005, roč. 43, č. 7, 3463–3466. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.43.7.3463–3466.2005.
13. DE BAERE, Thierry et al. *Classification of Ralstonia pickettii biovar 3/'thomasii' strains (Pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as Ralstonia mannitolytica sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2001, roč. 51, č. 2, 547–558. ISSN 1466-5026.
14. YABUUCHI, Eiko et al. *Transfer of Two Burkholderia and An Alcaligenes Species to Ralstonia Gen. Nov.: Proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1896) Comb. Nov. and Ralstonia eutropha (Davis 1969) Comb. Nov. Microbiology and immunology*. 1995, č. 39, s. 897-904. ISSN 0385-5600.
15. CHEN, Wen-Ming et al. *Ralstonia taiwanensis sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. International journal of*

- systematic and evolutionary microbiology*. 2001, roč. 51, č. 5, s. 1729-1735. ISSN 1466-5026.
16. GORIS, Johan et al. *Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as Ralstonia campinensis sp. nov., Ralstonia metallidurans sp. nov. and Ralstonia basilensis Steinle et al. 1998 emend. International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2001, roč. 51, č. 5, 1773–1782. ISSN 1466-5026.
17. VANDAMME, Peter and COENYE, Tom. *Taxonomy of the genus Cupriavidus: a tale of lost and found. International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2004-11-01, roč. 54, č. 6, s. 2285-2289. ISSN 1466-5026. DOI: 10.1099/ijs.0.63247-0.
18. DEGAND, Nicolas et al. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cystic Fibrosis Patients. Journal of Clinical Microbiology*. 2008, roč. 46, č. 10, s. 3361-3367. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.00569-08.
19. SEGONDS, Christine, PAUTE, Sandrine. and CHABANON, Gérard. *Use of Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis for Identification of Ralstonia and Pandoraea Species: Interest in Determination of the Respiratory Bacterial Flora in Patients with Cystic Fibrosis. Journal of clinical microbiology*. 2003, roč. 41, č. 7, 3415–3418. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.41.7.3415–3418.2003.
20. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-868-5000-5.*
21. YABUUCHI, Eiko and YANO, Ikuya. *Achromobacter gen. nov. and Achromobacter xylooxidans (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev. International Journal of Systematic Bacteriology*. 1981-10-01, roč. 31, č. 4, s. 477-478. ISSN 0020-7713. DOI: 10.1099/00207713-31-4-477.

22. YABUUCHI, Eiko et al. *Emendation of genus Achromobacter and Achromobacter xylosoxidans (Yabuuchi and Yano) and proposal of Achromobacter ruhlandii (Packer and Vishniac) comb. nov., Achromobacter piechaudii (Kiredjian et al.) comb. nov., and Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans (Ruger and Tan) comb. nov. Microbiology and immunology. 1998, roč. 42, č. 6, s. 429-438. ISSN 0385-5600. PMID: 9688077.*
23. COENYE, Tom et al. *Kerstersia gyiorum gen. nov., sp. nov., a novel Alcaligenes faecalis-like organism isolated from human clinical samples, and reclassification of Alcaligenes denitrificans Ruger and Tan 1983 as Achromobacter denitrificans comb. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2003-11-01, roč. 53, č. 6, s. 1825-1831. ISSN 1466-5026. DOI: 10.1099/ijs.0.02609-0.*
24. LAMBIASE, A. et al. *Achromobacter xylosoxidans respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. European Journal of Clinical Microbiology. 2011, roč. 30, č. 8, s. 973-980. ISSN 0934-9723. DOI: 10.1007/s10096-011-1182-5.*
25. MAGNI, Annarita et al. *Achromobacter xylosoxidans Genomic Characterization and Correlation of Randomly Amplified Polymorphic DNA Profiles of Cystic Fibrosis Patients. Journal of Clinical Microbiology. 2010, roč. 48, č. 4, s. 1035-1039. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.02060-09.*
26. LIU, Lixia et al. *Ribosomal DNA-Directed PCR for Identification of Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans Recovered from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients. Journal of clinical microbiology. 2002, roč. 40, č. 4, s. 1210-1213. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.40.4.1210-1213.2002.*
27. NAZARET, S. et al. *RISA-HPLC analysis of lung bacterial colonizers of cystic fibrosis children. Journal of microbiological methods. 2009, roč. 76, č. 1, s. 58-69. ISSN 0167-7012.*

28. KRZEWINSKI, Jay W. et al. *Use of Random Amplified Polymorphic DNA PCR To Examine Epidemiology of Stenotrophomonas maltophilia and Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans from Patients with Cystic Fibrosis. Journal of clinical microbiology.* 2001, roč. 39, č. 10, 3597–3602. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.39.10.3597–3602.2001.
29. VOTAVA, Mroslav et al *Lékařská mikrobiologie II.: Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii.* 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 309 s. ISBN 80-210-2272-8.
30. HAVLIŠ, Jan *Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. Vesmír: přírodovědecký časopis.* Praha: Etna, 1999, roč. 78, č. 8, s. 448. ISSN 1214-4029.
31. KÁŠ, Jan, KODÍČEK, Milan a VALENTOVÁ, Olga. *Laboratorní techniky biochemie.* 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
32. JILL, E. Clarridge. *Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clinical microbiology reviews.* 2004, roč. 17, č. 4, 840–862. ISSN 0893-8512. DOI: 10.1128/CMR.17.4.840–862.2004.
33. KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně.* Vyd. 1. Brno : Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Vinařská 6, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
34. ŠMARDA, Jan, et al. *Metody molekulární biologie.* 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
35. JURÁNKOVÁ, Jana et al. *Klinická mikrobiologie v laboratorní praxi: bakalářský obor Zdravotní laborant.* 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2011, 73 s. ISBN 978-802-1056-572.