

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Nikol Horáková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Burkholderia cepacia
Bakalářská práce

2023

Nikol Horáková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Nikol Horáková**
Osobní číslo: **C20220**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: ***Burkholderia cepacia***
Téma práce anglicky: ***Burkholderia cepacia***
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovat rešerši zaměřenou na mikroorganismy rodu *Burkholderia*.
2. Především se zaměřit na charakteristiku druhu *Burkholderia cepacia*.
3. Popsat onemocnění způsobená *Burkholderia cepacia*.
4. Shrnout laboratorní průkaz *Burkholderia cepacia* a citlivost na antibakteriální léčiva.
5. Vyhodnotit možnosti prevence a léčby.
6. Bakalářskou práci zpracovat v souladu se směrnicí č. 7/2019 univerzity Pardubice "Pravidla pro odevzdání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací".

Rozsah pracovní zprávy: 25 s.
Rozsah grafických prací: dle potřeby
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Markéta Vydržalová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: 23. prosince 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. června 2023

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem *Burkholderia cepacia* jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 06. 2023

Nikol Horáková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí své práce RNDr. Markétě Vydržalové, Ph.D., za trpělivost, kterou měla při vedení mé práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou *B. cepacia*. Práce se zaměřuje na charakteristiku rodu, laboratorní diagnostikou a citlivost na vybraná antibakteriální léčiva. Dále jsou uvedena rizika infekce pro pacienty s cystickou fibrózou.

KLÍČOVÁ SLOVA

Burkholderia cepacia, BCC, cystická fibróza, využití v zemědělství

TITLE

Burkholderia cepacia

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with *B. cepacia*. The thesis focuses on the characteristics of the genus of the bacterium, the possibilities of its identification and with antibiotic susceptibility. It also discusses what danger this bacterium poses to patients with cystic fibrosis.

KEYWORDS

Burkholderia cepacia, BCC, cystic fibrosis, agricultural use

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD.....	12
1 Rod <i>Burkholderia</i>	13
1.1 Charakteristika	13
1.1.1 Faktory virulence	14
1.2 Výskyt.....	17
2 <i>Burkholderia cepacia</i>	17
2.1 Charakteristika	17
2.2 Onemocnění	17
2.2.1 Cystická fibróza	17
3 Laboratorní diagnostika	19
3.1 Kultivace.....	19
3.1.1 Krevní agar	19
3.1.2 MacConkey agar	20
3.1.3 Čokoládový agar	21
3.1.4 <i>Burkholderia Cepacia</i> Selektivní Agar (BCSA)	22
3.2 Identifikace	22
3.2.1 Mikroskopie	22
3.2.2 Biochemické vlastnosti	23
3.2.3 MALDI-TOF/MS.....	25
3.2.4 Polymerázová řetězová reakce.....	26
3.2.5 Pulzní gelová elektroforéza	27
3.3 Citlivost na antibiotika.....	27
3.3.1. Metody určování antibiotické citlivosti	29
4 Infekce spojené se zdravotní péčí	30
5 Využití <i>Burkholderia cepacia</i> v zemědělství a ekologii.....	31
ZÁVĚR	33

POUŽITÁ LITERATURA	34
--------------------------	----

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1	Fylogenetický strom recA genu BCC (Mahenthiralingam et. al, 2002)	14
Obrázek 2	<i>Burkholderia cepacia</i> exprimující Cbi (Holmes et. al, 1998)	16
Obrázek 3	Měkká hniloba cibule (Holmes et. al, 1998)	17
Obrázek 4	Rentgen plic s CF (Jakubec, 2006).....	18
Obrázek 5	<i>Burkholderia cepacia</i> krevní agar 24 h (web Microbe canvas)	19
Obrázek 6	<i>Burkholderia cepacia</i> krevní agar 48 h (web Microbe canvas)	20
Obrázek 7	<i>Burkholderia cepacia</i> McConkey agar (web Microbe canvas).....	21
Obrázek 8	<i>Burkholderia cepacia</i> čokoládový agar (Landes et. al, 2016).....	21
Obrázek 9	<i>Burkholderia cepacia</i> BCSA (Landes et. al, 2016).....	22
Obrázek 10	<i>Burkholderia cepacia</i> Gramovo barvení převzato (Nimri, 2017)	23
Obrázek 11	<i>Burkholderia cepacia</i> , elektronová mikroskopie (Hirsch, 2019).....	23
Obrázek 12	Průběh polymerázové řetězové reakce (Beránek, 2016).....	26
Obrázek 13	Mechanismy ATB rezistence (Rhodes et. al, 2016).....	28
Tabulka 1	Biochemické vlastnosti <i>Burkholderia cepacia</i> komplexu (Devanga Ragupathi et. al., 2019)	24
Tabulka 2	Biochemické vlastnosti komplexu <i>Burkholderia cepacia</i> (MIKROLATEST®).....	25
Tabulka 3	Přehled specifických primerů pro analýzu <i>Burkholderia cepacia</i> komplexu (Mahenthiralingam et. al., 2000)	27
Tabulka 4	MIC antibiotik inhibující <i>Burkholderia cepacia</i> (mg/l)	30

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

BCC	<i>Burkholderia cepacia</i> komplex
CF	Cystická fibróza
CS	Cepacia syndrom
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PFGE	Pulzní gelová elektroforéza
RFLP	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RND	z angl. Resistance-Nodulation-cell Division
QS	Quorum sensing
<i>B.</i>	Označuje mikroorganismy patřící k rodu <i>Burkholderia</i>

ÚVOD

Burkholderia cepacia je aerobní gram-negativní bakterie z rodu *Burkholderia*, která je oportunitním patogenem lidí, zvířat a rostlin. Největší problémy tato bakterie způsobuje pacientům s cystickou fibrózou, kdy infekce způsobí nekrotizující pneumonii. Naopak v zemědělství se tato bakterie ukazuje jako poměrně užitečná, a to díky svým schopnostem odstraňovat z půdy toxické látky.

1 Rod *Burkholderia*

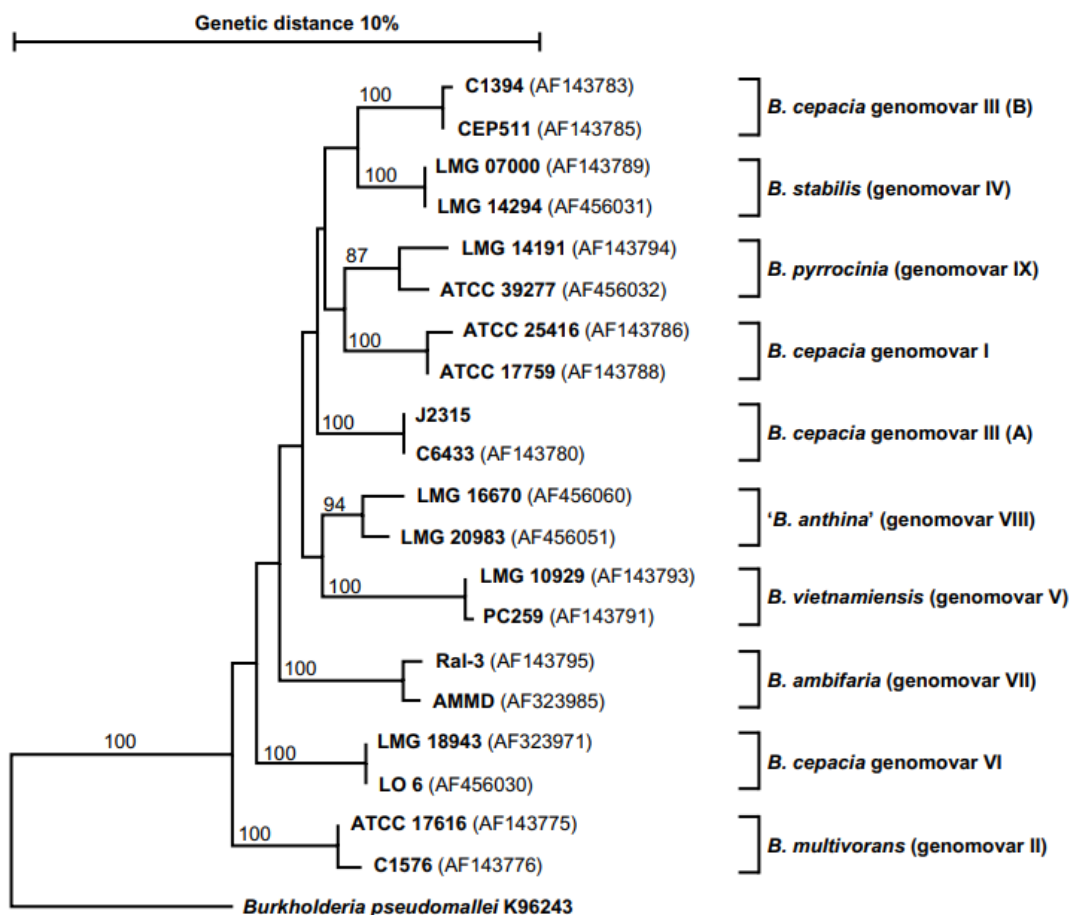
Rod patří do třídy *Betaproteobacteria* v rámci kmene *Proteobacteria*. Původně zástupci tohoto rodu patřil do rodu *Pseudomonas*. V roce 1950 byl poprvé Burkholderem popsán druh *Pseudomonas cepacia* jako původce bakteriální hniloby cibulí. Při vytvoření rodu *Burkholderia*, v roce 1992, jej tvořilo celkem sedm druhů. Během posledních dvaceti let bylo do rodu zařazeno mnoho nových druhů. Přesto se ukázalo, že několik druhů bylo charakterizováno špatně a bylo nutné je reklasifikovat. V současnosti je do rodu řazeno 90 druhů. Mikroorganismy, které jsou řazeny do tohoto rodu představují rychle rostoucí skupinu, vyskytující se celosvětově ve všech možných prostředích. Některé můžeme nalézt v prosté půdě nebo ve sladké vodě ale většina se vyskytuje ve spojení s hostiteli lidskými, zvířecími, rostlinnými a houbami [1, 9].

Burkholderia cepacia komplex (BCC) je v rámci rodu shluk blízké příbuzných druhů, které jsou známé jako potenciálně život ohrožující patogeny u pacientů s cystickou fibrózou (CF). Zároveň jsou intenzivně studovány pro využití v biotechnologiích, kde se dají využít k podpoře růstu a výnosu rostlin, biologické kontrole rostlinných škůdců, bioremediaci skládek, kontaminovaných půd a podzemní vody [1, 2].

Některé druhy, jmenovitě *B. cariophylli*, *B. plantarii*, *B. glumae* a *B. andropogonis* jsou rostlinnými patogeny. Ovšem většina burkhoderií si s rostlinami vyvinula různé nepatogenní anebo prospěšné interakce [9].

1.1 Charakteristika

Burkholderia (B.) cepacia komplex zahrnuje aerobní, nesporulující, na katalázu pozitivní, laktózu nezkvašující gram – negativní bakterie, které jsou si podobné svými vlastnostmi, ale geneticky se liší. Komplex se skládá z devíti genomovarů (obr.1), genomovar I *B. cepacia*, genomovar II *B. multivorans*, genomovar III *B. cenopacia*, genomovar IV *B. stabilis*, genomovar V *B. vietnamiensis*, genomovar VI *B. dolosa*, genomovar VII *B. ambifaria*, genomovar VIII *B. anthina* a genomovar XI *B. pyrrocinia*. Jednotlivé genomovary jsou si velmi podobné a nejdou jednoduše rozlišit na základě biochemických testů. Rychlou metodou identifikace genomovarů je analýza polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) genu *recA* [4].



Obrázek 1 Fylogenetický strom *recA* genu BCC (Mahenthiralingam et. al, 2002)

1.1.1 Faktory virulence

Faktory virulence BCC zvyšují patogenitu v různých fázích infekce, zejména v epitelálních buňkách plic hostitele [6].

Lipopolysacharidy

Lipopolysacharidy (LPS) jsou hlavní složkou vnější membrány gram negativních bakterií, vyvolávající imunitní reakce v hostiteli. Během kolonizace hostitele jsou LPS rozpoznány imunitním systémem, tomu bakterie brání modifikacemi těchto molekul. Modifikace zahrnují změnu struktury a délky cukerných řetězců, nebo také modifikace lipidu A. Během imunitní reakce dochází k produkci cytokinů a chemokinů, které přitahují buňky imunitního systému do místa infekce a podporují zánět. To může být pro hostitele škodlivé, protože zánětem způsobené poškození tkáně může přispět k patogenezi infekce. Interakce LPS s receptory hostitelských buněk usnadňuje bakteriím kolonizaci tkání. U pacientů s cystickou fibrózou vyvolává LPS zánět a poškození tkáně, protože tyto jedinci mají defekt v proteinu regulátoru transmembránové vodivosti. Tím je zhoršeno odstraňování bakterií a zánětlivých

molekul z plic a dochází tak ke kumulaci LPS v plicích, což vede k přehnané imunitní odpovědi, následnému chronickému zánětu, a nakonec k poklesu funkce plic [3,4].

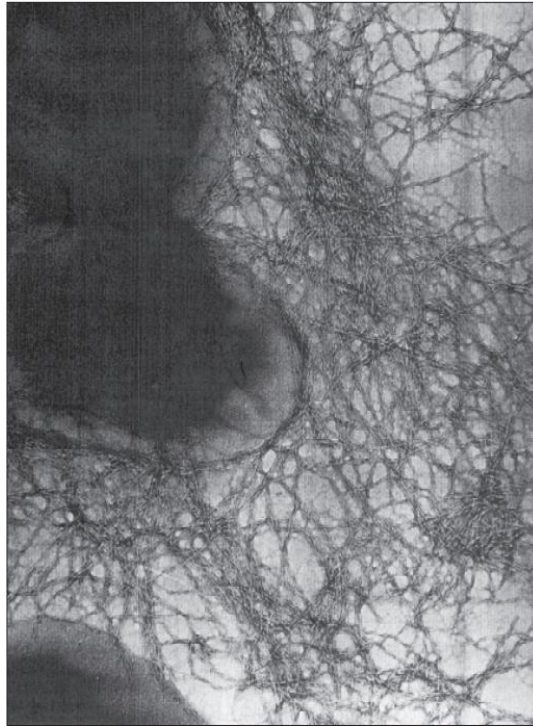
Biofilm

BCC tvoří biofilmy na abiotických površích stejně jako na biotických. Mezi hlavní povrchy, na kterých bakterie tvoří biofilm patří zejména buňky plicního epitelu, kde nejspíše hraje hlavní roli v trvalé infekci u pacientů s cystickou fibrózou. V souvislosti s touto vlastností si *B. cepacia* vyvinula rezistenci vůči antibiotikům. Biofilmová matrice tvořená BCC bakteriemi pravděpodobně podporuje jejich přežití v hostitelských buňkách a zvyšuje odolnost vůči léčivům. Pro vývoj biofilmu je také důležitá adheze k povrchu buněk zejména pomocí pilů nebo bičíků, ty často zastávají funkci adhezinů. Bakterie BCC mají pět typů pilů a to pilovité, vláknité, hrotité, hrotové a kabelové. Nejdůležitější roli při adhezi hrají kabelové pili kódované genem *cblA* (obr.2) [5, 6].

Existuje pouze malé množství inhibitorů biofilmu, které působí proti tvorbě biofilmu u *B. cepacia*. U *B. cepacia* rezistentní na léčiva je uváděno, že tvorbu biofilmu a produkci faktorů virulence inhibuje několik rostlinných derivátů, mořských bioproduktů a syntetických inhibitorů. Například celulóza inhibuje quorum sensing (QS) a snižuje růst biofilmu a poly (acetyl, arginyl) glukosamin (glykopolymer) zmenšuje tloušťku biofilmu [6].

System QS byl poprvé popsán u *Vibrio fischeri* v 60. a 70. letech minulého století a jedná se o schopnost gram-negativních bakterií komunikovat mezi sebou pomocí signálních molekul autoinduktorů. Jakmile se molekuly autoinduktorů v médiu nahromadí, zvýší se hustota populace buněk a bakterie získají schopnost vnímat informace umožňující sledování změn v jejich počtu, upravovat genovou expresi a regulovat fyziologické funkce. QS řídí produkci faktorů virulence, toxinů, biofilmů, dále také sporulaci bioluminiscenci a je tak důležitý pro patogenezi.

B. cepacia má dva quorum sensing systémy které se zásadně podílejí na syntéze faktorů virulence a při vývoji rezistence vůči antibiotikům [6].



Obrázek 2 *Burkholderia cepacia* exprimující Cbi (Holmes et. al, 1998)

Siderofory

Produkce sideroforů umožňuje bakteriím vázat železo v hostiteli a tím vyvolat a udržet infekci. *B. cepacia* exprimuje nejméně 3 sideroforové transportní systémy a sice pyochelin, cepabaction a azurechelin. Pyochelin můžeme nalézt i u *Pseudomonas aeruginosa*, ale ten není chemicky příbuzný s pyochelinovým sideroforem *B. cepacia*. S produkcí pyochelinu souvisí i morbidita a mortalita u pacientu s CF. Schopnost *B. cepacia* se šířit po celém organismu a vyvolat větší zánětlivou reakci v důsledku zvětšení plochy infekce v plicích, může zvyšovat pyochelin [7].

Sekreční systém typu III

Řada gram-negativních bakterií využívá sekreční systém typu III k dodávání proteinů spojených s virulencí, označovaných jako efektorové proteiny, do hostitelských buněk. Přenos efektorových proteinů závislý na sekrečním systému typu III je spojeno i s invazí *Salmonella enterica* sérovar Thyphimurium a *Shigella flexneri*, tvorbou lézí enteropatogenní *Escherichia coli*, cytotoxicitou *Pseudomonas aeruginosa*, vyhýbání se imunitní odpovědi hostitele a fagocytóze u bakterií *Yersinia* spp. a *Bordetella bronchoseptica* a intracelulárním přežíváním *S. enterica* sérovar Thyphimurium. Dále jej také využívá řada fytopatogenů k způsobení chorob u náchylných rostlin a hypersenzitivní reakci u odolných rostlin [8].

1.2 Výskyt

BCC bakterie můžeme najít úplně všude v půdě, vodě slané i sladké, rhizosféře rostlin (obr.3), různých druhů zvířat, lidí a v nemocničním prostředí. V každém z těchto prostředí zastává BCC jiné funkce, v půdě mohou izoláty BCC fungovat jako biologická kontrola rostlinných patogenů, nebo bioremediace rekalitrantních xenobiotik a podpora růstu rostlin. V lidském organismu ale funguje jako oportunitní patogen, nebezpečný zejména pro lidi s cystickou fibrózou a jiným chronickým onemocněním plic [9].



Obrázek 3 Měkká hniloba cibule (Holmes et. al, 1998)

2 *Burkholderia cepacia*

2.1 Charakteristika

Burkholderia cepacia patří mezi gram negativní aerobní, nesporulující tyčky. Bakterie je pohyblivá s respiračním metabolismem a je pozitivní na katalázu a oxidázu [2].

2.2 Onemocnění

2.2.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza, dříve označovaná jako mukoviscidóza je autozomálně recesivní nevyléčitelné onemocnění, postihující hlavně dýchací cesty, plíce, pankreas a další orgány.

Poprvé byla popsána americkou patoložkou Dorothy Andersonovou v roce 1938. Příčinou je mutace genu pro transmembránový regulátor vodivosti (CFTR) umístěný na dlouhém raménku 7. chromozomu. Mutace vede k poruše tvorby anebo funkce CFTR proteinu, který reguluje průtok vody a Cl^- iontů v plicních buňkách. Dysfunkce je možné dělit do šesti tříd z nichž jsou I-III spojovány s těžkým a IV-VI s lehčím průběhem onemocnění. Porucha funkce vede k postižení žláz s vnější sekrecí a neschopností potních žláz adekvátně absorbovat NaCl . Buňky více absorbují sodík a vodu a tím dochází k tvorbě abnormálně vazkého hlenu a v dýchacím ústrojí nastává mukostáza. Chloridové ionty zůstávají v hlenu a tím zabrání aktivaci defenzinů, to následně vede k poškození plicních obraných mechanismů. Na hlen následně nasedají chronické bakteriální infekce, hlavně BCC komplex, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* a *Pseudomonas aeruginosa*, a neutrofilní zánět. Proteázami a kyslíkovými radikály z leukocytů dochází k poškození dýchacích stěn s rozvojem bronchiektázie, obstrukční ventilační poruchy (obr.4) a respirační insuficience. Postižení pankreatu je charakteristické fibrózou a cystickou přestavbou s destrukcí Langerhansových ostrůvků a rozvojem diabetes mellitus. Při hepatobiliárním postižení dochází k fibróze až cirhóze jater. Kongenitální bilaterální absence vas deferens způsobuje obstrukční azoospermii, což vede u mužů k neplodnosti [14, 15].



Obrázek 4 Rentgen plic s CF (Jakubec, 2006)

U pacientů s cystickou fibrózou způsobuje *B. cepacia* chronickou plicní infekci, která může vyústit až v cepacia syndrom (CS). CS je akutní nekrotizující pneumonie, projevující se vysokou horečkou, bakteriemií a rychle postupujícím respiračním selháním a ve většině případů končí úmrtím. Výskyt této komplikace je z velké části neznámý, ale předpokládá se, že se snížil díky přísné segregaci pacientů v centrech pro léčbu CF [29].

3 Laboratorní diagnostika

3.1 Kultivace

3.1.1 Krevní agar

Krevní agar je základní kultivační půdou s přidavkem 5-10 % defibrinované savčí krve, nejčastěji jde o ovčí nebo koňské erythrocyty. Na tomto médiu se dají kultivovat většina bakterií, které se na základě hemolýzy dají ještě dále a přesněji zařadit.

Na krevním agaru roste *B. cepacia* ve formě bílých, hladkých, občas mukózních a mírně vyvýšených s nepravidelným okrajem (obr5, 6). Mnohé kmeny *B. cepacia* produkují žlutý nebo hnědý pigment a některé kmeny vykazují hemolýzu nebo tvorbu hnědého pigmentu [12].



Obrázek 5 *Burkholderia cepacia* krevní agar 24 h (web Microbe canvas)



Obrázek 6 *Burkholderia cepacia* krevní agar 48 h (web Microbe canvas)

3.1.2 MacConkey agar

Jde o selektivní a diferenční médium pro gram-negativní bakterie, které se dále na tomto agaru rozlišují podle schopnosti fermentovat laktózu. Při fermentaci laktózy tvoří bakterie organické kyseliny, které snižují pH půdy a ta se zbarvuje do růžova. Bakterie, které nemají schopnost fermentovat laktózu rostou ve formě neprůhledných bělavých kolonií [13].

Po 4 - 7denní inkubaci se často objevují kolonie tmavě růžové až červené barvy, protože bakterie oxidují laktózu (obr. 7) [12].



Obrázek 7 *Burkholderia cepacia* McConkey agar (web Microbe canvas)

3.1.3 Čokoládový agar

Tato půda je modifikací krevního agaru, která se připravuje smícháním agaru o teplotě 80 °C s krví. Erythrocyty horkem lyzují a uvolňují do půdy růstové faktory jako například NAD a hemin, je tedy vhodný ke kultivaci náročnějších mikroorganismu jako je *Haemophilus influenzae*.

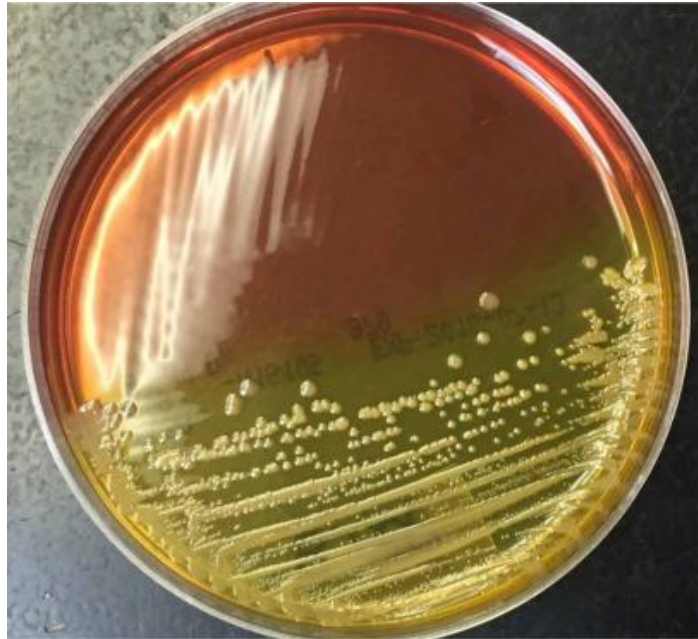
B. cepacia roste na ČA ve formě hladkých, lesklých kolonií s nepravidelným okrajem, tvořících zelený pigment (obr.8) [10].



Obrázek 8 *Burkholderia cepacia* čokoládový agar (Landes et. al, 2016)

3.1.4 *Burkholderia Cepacia* Selektivní Agar (BCSA)

Médium obsahuje jako nutriční složky kvasničný extrakt a kaseinový pepton, chlorid sodný pro udržení osmotické rovnováhy a agar. K inhibici růstu jiných mikroorganismů nacházejících se v respiračních sekretech obsahuje agar krystalovou violet, polymyxin B, gentamicin a vankomycin. Pro obohacení a diferenciaci je v médiu sacharóza a laktóza s fenolovou červení jako indikátorem pH. Bakterie BCC rostou na tomto agaru ve žlutých koloniích (obr.9) [10].



Obrázek 9 *Burkholderia cepacia* BCSA (Landes et. al, 2016)

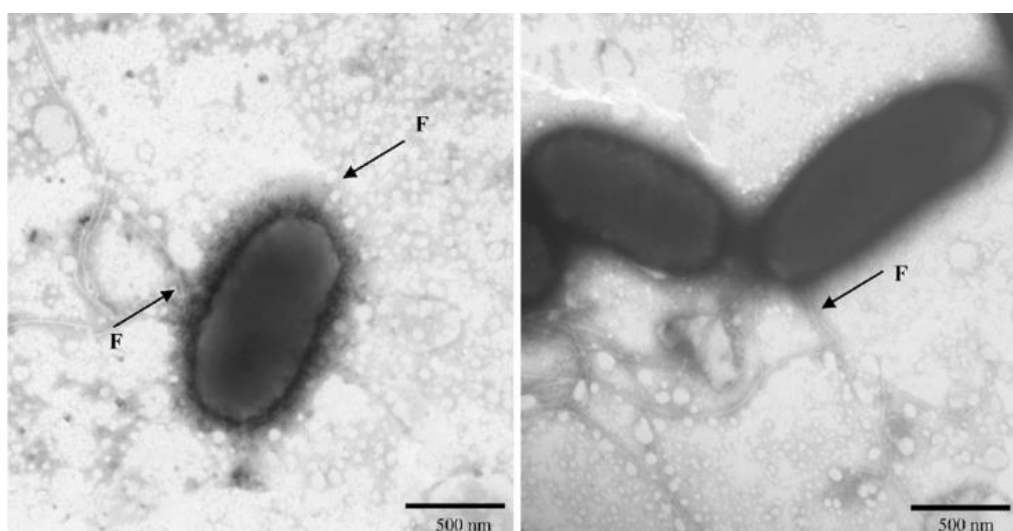
3.2 Identifikace

3.2.1 Mikroskopie

V mikroskopu mohou být pozorovány růžové gram-negativní tyčinky o velikosti 1-2,8 μm na 0,8 μm se zaoblenými konci vyskytující se jednotlivě nebo ve dvojicích. Na obrázku 10 je možné vidět *B. cepacia* ve světelném mikroskopu, obarvené Gramovým barvením, na obrázku 11 je *B. cepacia* v elektronovém mikroskopu šipka s označením F na obrázku ukazuje na bičík, který bakterie využívá k pohybu [16].



Obrázek 10 *Burkholderia cepacia* Gramovo barvení převzato (Nimri, 2017)



Obrázek 11 *Burkholderia cepacia*, elektronová mikroskopie (Hirsch, 2019)

3.2.2 Biochemické vlastnosti

Testování biochemických vlastností se běžně využívalo v rutinních klinických laboratořích k identifikaci BCC. Ačkoli z důvodu vysoké podobnosti biochemických výsledků nebylo dosaženo druhové identifikace. Devanga Ragupathi et al., (2019) ve své studii uvádějí, že automatizované systémy jako Phoenix, VITEK 2 dokáží identifikovat BCC, bakterie nepatřící k BCC a bakterie nepatřící do rodu *Burkholderia* s různou specifitou. Podle této studie jednoduché biochemické testy nejsou schopny rozlišit BCC od bakterií nepatřících do komplexu z důvodu překrývajících se biochemických profilů. Systém Phoenix chyboval v 23 %

případů identifikace BCC, VITEK 2 chybně identifikoval BCC pouze ve 12 % případů.

V tabulce 1 jsou uvedeny biochemické vlastnosti genomovarů *B. cepacia* [31].

Tabulka 1 Biochemické vlastnosti *Burkholderia cepacia* komplexu (Devanga Ragupathi et. al., 2019)

<i>Burkholderia cepacia</i> - genomovar							
Test	I	II	III	IV	V	VI	VII
Oxidáza	+	+	+	+	+	+	+
Sacharóza	+/-	-	+/-	-	+	-	+
Adonitol	+/-	+	+/-	+/-	-	+	+
Laktóza	+/-	+	+/-	+	+	+	+
Lysin dekarboxyláza	+	+/-	+	+	+	-	+
Ornitin dekarboxyláza	+/-	-	+/-	+	-	-	-
Zkapalnění želatiny	+/-	-	+/-	+	-	-	+
Hydrolyza eskulinu	+/-	-	+/-	-	-	-	+/-
Aktivita β – galaktosidázy	+	+	+	-	+	+	+
Růst při 42 °C	+/-	+	+/-	-	+	+	+/-
β -hemolýza	-	-	-	-	+/-	-	+/-

Vysvětlivky: + pozitivní reakce, - negativní reakce, +/- variabilní reakce

V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky testu NEFERMtest 24 od firmy MIKROLATEST[®], souprava je používána k rutinnímu stanovení gram-negativních nefermentujících bakterií čeledí *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae* a druhu *Plesiomonas shigelloides*. Celkem souprava umožňuje pomocí 24 testů v mikrotitrační destičce určit 40 druhů. Výsledky testu se hodnotí po 24hodinové inkubaci [37].

Tabulka 2 Biochemické vlastnosti komplexu *Burkholderia cepacia* (MIKROLATEST®)

<i>Burkholderia cepacia</i> komplex			
Testovaná vlastnost	Výsledek testu	Testovaná vlastnost	Výsledek testu
Kataláza	+	Xylóza	+/-
Oxidáza	(+)	Arabinóza	+/-
Ureáza	(-)	α -galakrosidáza	(-)
Arginin	-	β -galaktosidáza	+
Ornitin	+/-	Malonát	+
Lysin	+/-	Galaktóza	+
Acetamid	+/-	Maltóza	+
β -glukosidáza	+/-	Celobióza	+
NAG	+/-	Sacharóza	+/-
Simmons citrát	+	Inositol	+/-
Laktóza	+	γ -glutamyltrasferáza	+
Manitol	+/-	Fosfatáza	+
Trehalóza	(+)	Eskulin	(-)

Vysvětlivky: + pozitivní reakce, - negativní reakce, +/- variabilní reakce, (+) většinou pozitivní, (-) většinou negativní, NAG = N-acetyl- β -D-glukosaminidáza

3.2.3 MALDI-TOF/MS

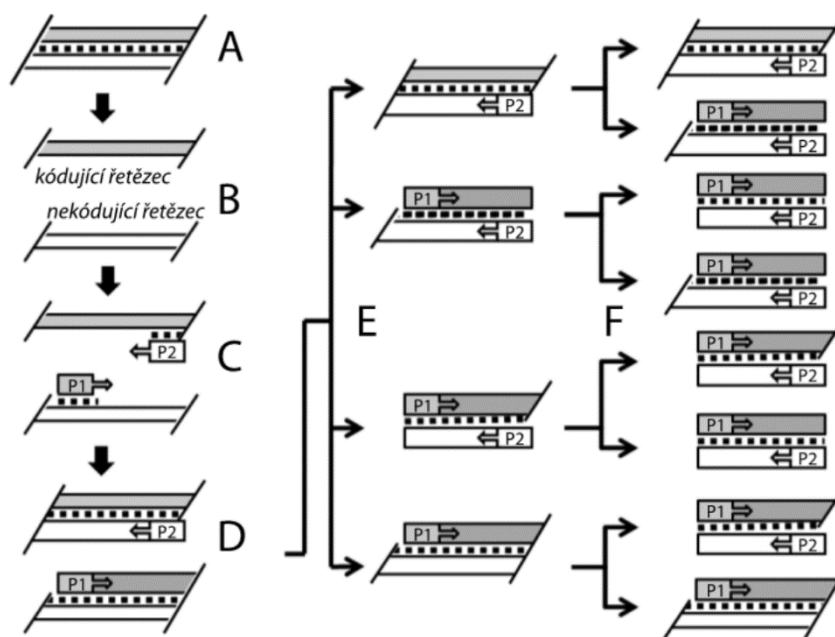
Tato metoda se využívá v mnoha oblastech od analytiky až po klinickou diagnostiku. V klinické mikrobiologii je tato metoda využívána převážně k identifikaci bakterií. Proces identifikace se dá tímto způsobem mnohonásobně urychlit a bakterii jsme schopni identifikovat do hodiny od vyhodnocení nárustu na plotně. Samotná analýza je velmi jednoduchá, kolonie z plotny je přenesena na jamku analytické destičky, kde je po zaschnutí smíchána s matricí, která napomáhá desorpci a ionizaci vzorku absorpcí energie laseru. Destička je následně umístěna do hmotnostního spektrometru přístroje MALDI-TOF, kde je směs vzorek-matrice pulzním laserem odpařena a ionizována. Ionizované molekuly jsou po urychlení v elektrickém poli poslány letovou trubicí k detektoru. Detektor zaznamenává čas, za který ion proletěl trubicí. Specializovaný software pak porovná naměřené spektrum s referenčními databázemi a identifikuje mikroorganismus [32].

Studie z roku 2022 podrobila analýze 53 kolonií naznačujících přítomnost BCC identifikaci pomocí MALDI-TOF. V této studii se metoda osvědčila jako velmi účinná pro

rozlišení jednotlivých druhů BCC. Kdy na rodovou úroveň bylo určeno 100 % vzorků a na druhovou úroveň 96,2 % (51/53) [33].

3.2.4 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda založena na komplementaritě dvou DNA primerů s templátovou DNA. Kódující řetězec DNA je komplementární s nekódujícím primerem a naopak nekódující řetězec DNA je komplementární s kódujícím primerem. Primery mají obvykle délku 20 nukleotidů. Při polymerázové reakci vznikají nové řetězce díky katalytické aktivitě DNA polymeráz ve směru 5'-3'. Nové řetězce mohou po tepelné denaturaci hybridizovat s druhým použitým primerem. Vícenásobným opakováním denaturace, po které dojde k ochlazení, mohou teplotně stálé primery opětovně hybridizovat s DNA (annealing) a polymeráza vždy zdvojnásobí počet řetězců (extenze, elongace). Opakováním těchto fází získá polymerázová reakce *in vitro* cyklický charakter (obr.12) a označuje se jako PCR [34].



Obrázek 12 Průběh polymerázové řetězové reakce (Beránek, 2016)

Identifikace *B. cepacia* je založena na analýze genů 16S rRNA a recA. Primery využívané k amplifikaci genů jsou různé a liší se v závislosti na laboratoři. Ve studii Seo et Tsuchia (2004) byly pro amplifikaci genů využity tyto primery, UNI1 a UNI2 pro 16S rRNA a BCR1 a BCR2 pro recA. Analýza polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) genu 16SA rRNA rozdělila 119 testovaných kmenů do dvou vzorů. Vzor 1 odpovídal *B. vietnamiensis*, vzor 2 obsahoval kmeny *B. cepacia*, *B. cenopacia* a *B. stabilis*.

Při recA PCR bylo sedmdesát tři kmenů identifikováno jako *B. cepacia*, 33 jako *B. cenopacia*, tři jako *B. stabilis* a jeden jako *B. vietnamiensis*. Sekvence primerů použitých ve studii jsou uvedeny v tabulce 3, tak jak byly navrženy Mahenthiralingam et al., (2000) [35].

Tabulka 3 Přehled specifických primerů pro analýzu *Burkholderia cepacia* komplexu (Mahenthiralingam et al., 2000)

Specifita a název primeru		Sekvence (5'-3')	Délka produktu
Univerzální 16S rDNA primer	UNI2	GACTCCTACGGGAGGCAGCAG	1020 bp
	UNI5	CTGATCCGCGATTACTAGCGATT C	
B. cepacia komplex recA	BCR1	TGACCGCCGAGAAGAGCAA	1043 bp
	BCR2	CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC	
recA sekvenující primer	BCR3	GTCGCAGGCGCTGCGCAA	532 bp
	BCR4	GCGCAGCGCCTGCGACAT	527 bp
B. cepacia genomvar I	BCRG11	CAGGTCGTCTCCACGGGT	492 bp
	BCRG13	CACGCCGATCTTCATACGA	
B. multivorans	BCRBM1	CGGCGTCAACGTGCCGGAT	714 bp
	BCRBM2	TCCATCGCCTCGGCTTCGT	
B. cepacia genomvar III-A	BCRG3A 1	GCTCGACGTTCAATATGCC	378 bp
	BCRG3A 2	TCGAGACGCACCGACGAG	
	BCRG3B 1	GCTGCAAGTCATCGCTGAA	
B. cepacia genomvar III, RG-B	BCRG3B 2	TACGCCATCGGGCATGCT	781 bp
	BCRG41	ACCGGCGAGCAGGCGCTT	
B. cepacia genomvar IV, RG-4	BCRG42	ACGCCATCGGGCATGGCA	647 bp
	BCRBV1	GGGCGACGGCGACGTGAA	
B. vietnamiensis, RG-BV	BCRBV2	TCGGCCTTCGGCACCACT	378 bp

3.2.5 Pulzní gelová elektroforéza

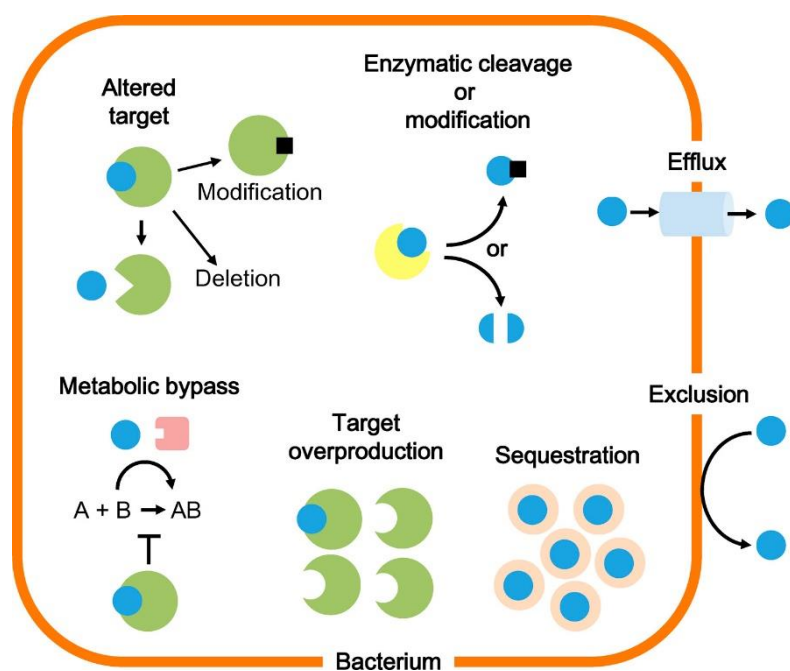
Jedná se o výkonnou genotypizační techniku používanou k separaci velkých molekul DNA po jejich natrávení jedinečnými restrikčními enzymy a nanesení na gelovou matici pod elektrickým polem, které periodicky mění směr. Pulzní gelová elektroforéza (PFGE) je variantou elektroforézy v agarózovém gelu, která umožňuje analyzovat fragmenty DNA o řád větší než při běžné analýze restrikčními enzymy [36].

3.3 Citlivost na antibiotika

Citlivost bakterií k antibiotikům vyjadřuje, jak efektivně antibiotikum působí na danou bakterii tzn. bakterie je citlivá. Antibiotická rezistence je stav, kdy si bakterie vyvine schopnost vyhnout se látkám, které je mají ničit. Infekce způsobené rezistentními kmeny bakterií jsou

hůře léčitelné, nebo se nedají léčit vůbec, a v současnosti představují velkou hrozbu pro veřejné zdraví [18,30].

Bakterie využívají k rezistenci různé mechanismy. Mezi tyto mechanismy patří vyloučení látky z buňky nebo její snížený průnik do buňky omezením zprostředkovaným buněčným obalem, aktivní eflux z buňky, enzymatická inaktivace látky, buďto štěpením substrátu, nebo chemickou modifikací (acetylace, fosforylace). Dále změna cíle pomocí bodových mutací DNA a vzácněji delecí. Citlivý cíl může být zaměněn za cíl rezistentní pomocí metabolického bypassu, bakterie také může začít nadprodukovat cíle pomocí zvýšené transkripce nebo zmnožením genu. Jako poslední mechanismus je na obrázku 13 uvedena sekvestrace látky z buňky specifickými vazebnými proteiny [19].



Obrázek 13 Mechanismy ATB rezistence (Rhodes et. al, 2016)

BCC bakterie využívají mechanismy rezistence zmíněné výše. Konkrétně snižují permeabilitu bakteriální membránové struktury, nadměrně exprimují RND efluxní systém, provádí změny v cílovém místě a produkují penicilinázy PenA, indukovatelné β -laktamázy třídy C a enzym dihydrofolátreduktázu (rezistence na trimethoprim/sulfametoxazol) [20].

Při terapii se jako první volba využívá trimethoprim/sulfametoxazol, v případě rezistence se jako alternativa využívá ceftazidim a meropenem buď samostatně nebo v kombinaci s aminoglykosidy či minocyklinem. Různé studie však ukazují, že izoláty BCC jsou rezistentní vůči polymyxinům, aminoglykosidům a většině β -laktamáz (hlavně cefalosporinům 1. a 2. generace). Tyto rezistence spolu s faktem, že rezistence se vyvíjí i během terapie, značně ztěžují léčbu [20].

3.3.1. Metody určování antibiotické citlivosti

Disková difuzní metoda

Metoda je založena na sledování inhibiční zóny růstu kolem papírového disku napuštěného antibiotikem. Na agarovou plotnu je naočkována suspenze bakterií a poté jsou na naočkovanou plotnu rozloženy disky s antibiotiky. Po inkubaci trvající 18-24 hodin při 37 °C, se změří inhibiční zóny kolem disku. Je-li zóna větší nebo rovna hodnotě z tabulek je bakterie vůči antibiotiku citlivá. Tato metoda je kvalitativní a říká pouze jestli je bakterie citlivá nebo rezistentní [21].

E – test

Jde o kvantitativní alternativu diskové metody, kdy se na naočkovanou plotnu položí porézní papírový proužek, napuštěný antibiotikem s klesající koncentrací. Po inkubaci se kolem proužku vytvoří kapkovitá zóna inhibice. V místě, kde zóna protne proužek odečítáme minimální inhibiční koncentraci antibiotika, tedy nejnižší koncentraci, která zabrání růstu antibiotika. Tato metoda je velmi nákladná a v rutinní praxi ne moc používaná [21].

Bujónová diluční metoda

Tato kvantitativní metoda slouží k zjištění míry citlivosti k antibiotiku. Do roztoku antibiotika o přesně známé koncentraci, postupně ředěného bujonem (vzniká řada ředění s klesající koncentrací), se naočkuje bakteriální suspenze. Po inkubaci sledujeme zákal v jednotlivých ředěních, tam kde se zákal nevytvořil, zabránilo antibiotikum růstu bakterií. Tato metoda slouží k určení minimální inhibiční koncentrace. V současnosti je metoda součástí automatizovaných přístrojů, sloužících k identifikaci bakterií [21].

Citlivost *Burkholderia cepacia* komplex na antibiotika

Protože neexistuje žádná dohoda o tom, jaká metoda testování antibiotické rezistence je nejvhodnější, vydávají Institut klinických a laboratorních standardů (CLSI) a Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST) různá doporučení pro testy. Podle CLSI je pro testování ceftazidimu, chloramfenikolu, levofloxacinu, meropenemu, minocyklinu, ticarcilin/clavulanatu a trimethoprim/sulfametoxazolu nejvhodnější agarová diluční a bujonová mikrodiluční metoda. Zatímco disková difuzní metoda je vhodná k zjištění citlivosti k ceftazidimu, meropenemu, minocyklinu a trimethoprim/sulfametoxazolu.

Studie Fehlberg et al., (2016) se zabývala testováním citlivosti BCC bakterií u 82 izolátů sesbíraných během let 1995-2018 ve dvou brazilských fakultních nemocnicích, izoláty byly ze

sputa, krve, tracheálního aspirátu, katetrů, moči a jiných. Všechny byly odebrány od pacientů s cystickou fibrózou a identifikovány jako bakterie BCC. Tato studie využívala k testování antimikrobiální citlivosti tyto metody: agarová diluční metoda, bujonová mikrodiluční metoda, E-test a disková difuzní metoda. Výsledky jednotlivých metod byly následně porovnávány mezi sebou. Z porovnání metod bylo usouzeno, že pro testování citlivosti BCC bakterií jsou nejvhodnější agarová diluční a bujonová mikrodiluční metoda, naopak u diskové difuzní metody byla prokázána vysoká míra chyb. Výsledky MIC antibiotik na *B. cepacia* získané různými autory jsou uvedeny v tabulce 4 [20].

Tabulka 4 MIC antibiotik inhibující *Burkholderia cepacia* (mg/l)

Antibiotikum	1	2	3	4	5	6
Ceftazidim	8	>16	12	5,98	16	16
Chloramfenikol	32	>16	10	13,3	-	128
Levofloxacin	4	>4	-	-	8	8
Meropenem	4	>8	26	0,9	-	4
Minocyklin	4	-	25	-	-	8
ticarcilin/clavulanatu	-	>64	-	-	-	-
Piperacilin/tazobactan	32	>64	9	-	-	-
trimethoprim/sulfametoxazolu	≥1	>2/38	-	0,5	-	2

Legenda k tabulce:

1. Dale et al, 2017 (použitá metoda – bujonová mikrodiluční metoda)
2. Mahendra et al, 2015 (použitá metoda – mikrodiluční metoda)
3. Zhou et al, 2007 (použitá metoda – bujonová mikrodiluční metoda)
4. Rose et al, 2009 (použitá metoda – bujonová mikrodiluční metoda)
5. Traczewski et al, 2006 (použitá metoda – bujonová mikrodiluční metoda)
6. Fehlberg et al, 2016 (použitá metoda – bujonová mikrodiluční metoda)

4 Infekce spojené se zdravotní péčí

V nemocnicích představuje *B. cepacia* hrozbu pro pacienty s CF a imunokompromitované. U pacientů bez CF byla tato bakterie poprvé popsána v 50. letech minulého století jako patogen způsobující endokarditidy. Od té doby je spojována s katérovými infekcemi močových cest, infekcí ran a bakteriemiemi spojených s intravenózními katetry. Během vojenských cvičení na severu Floridy v roce 1971 byla označena za původce „hniloby nohou“ u vojáků. V 80. letech narostl počet infekcí *B. cepacia* hlavně ve spojitosti s plicními infekcemi. V nemocnicích, kde

se epidemie týkaly pacientů bez CF, byly způsobeny kontaminací běžného zdroje (dezinfekční přípravky, intravenózní roztoky). *B. cepacia* najdeme u pacientů bez CF velmi vzácně, ale pokud jsou nakaženi mohou působit jako přenašeči na pacienty s CF. Tento přenos je spojován se závažnými onemocněními a smrtí [22].

Abdallah et al., (2018), ve studii zabývající se ohnisky BCC mezi pacienty bez CF na jednotkách intenzivní péče mezi lety 1994–2017, bylo zjištěno, že z 36 případů propuknutí infekce BCC, byla nejčastějším původcem *B. cepacia* a to v 21 případech. Bakterie byla izolována z krve, dýchacích cest, moči, stolice, ran a abscesů, identifikace byla nejčastěji prováděna gelovou elektroforézou v pulzním poli. Studie také identifikovala zdroje nákazy ve 22 případech. Jednalo se o kontaminované zdravotnické prostředky. Kontaminace byly rozděleny na vnější (vnesená během používání) a vnitřní (kontaminace byla přítomná už při příjmu prostředku do nemocnice). Mezi vnitřně kontaminované produkty patřily kožní antiseptikum, intravenózní kofein citrát, gumové zátky lahviček s lipidovou emulzí, ústní voda bez alkoholu, ultrazvukový gel a hydratační tělový krém. Externě kontaminované byly lahvičky s infuzní tekutinou s chloridem sodným i 5 % dextrózou, používané k přípravě parenterální výživy novorozenců, roztok pro nebulizaci albuterolu, barvivo indigokarmín a destilovanou vodu používanou při nebulizaci, proplachování orogastrických sond a zvlhčování kyslíku. Další zdroje BCC byly kontaminované gumové zátky vícedávkových lahviček s amikacinem, mechanický ventilátor a analyzátor krevních plynů [23].

Dále studie shrnuje údaje o rizikových faktorech bakteriémie *B. cepacia* u kriticky nemocných pacientů bez CF. Jako faktory nezávisle spojené s bakteriemií uvádí zavedení centrálního žilního vstupu, selhání ledvin na hemodialýze, více bronchoskopických zákroků a nedávné břišní operace. Jako ochranný faktor označují autoři přítomnost perkutánní endoskopické gastrostomické sondy, její účinek nejspíše souvisí s její významnou rolí při snižování aspirace žaludku a zároveň minimalizuje používání nazogastrických sond, čímž omezuje kolonizaci dýchacích cest, která může vést k pneumonii [23].

5 Využití *Burkholderia cepacia* v zemědělství a ekologii

B. cepacia se ukázala jako velmi zajímavá z pohledu zemědělství jako prostředek pro biologickou kontrolu a biologickou degradaci. Její metabolická všestrannost ji umožňuje rozkládat chlorované aromatické substráty, toxické složky v pesticidech a herbicidech, a využívat je jako zdroj uhlíku. Pro životní prostředí je zásadní, že dokáže rozložit 2,4-dichlorfenoxycetovou kyselinu, silný herbicid dlouho zůstávající v půdě. Dále dokáže potlačit růst různých rostlinných patogenů, hlavně houbám rodu *Alternaria*, které způsobují plíseň listů

a stonků. *B. cepacia* brání jejich růstu a šíření, inhibicí klíčení spor. *B. cepacia* také kontroluje plísňové choroby způsobované *Alternaria solani*, *Alternaria brassicae* a *Alternaria brassicola*, postihující olejniny (řepka olejka a kanola). Také dokáže zabránit napadení rostlin ženšenu *Alternaria panax* a je účinná proti houbě *Aphanomyces euteiches*, která způsobuje hnilobu kořenů hrachu, vojtěšky a fazolí). *B. cepacia* tedy nabízí zdánlivě ekologickou alternativu k potenciálně toxickým pesticidům. Také lesnický průmysl nachází pro *B. cepacia* využití, a to jako ochranu semen stromů před houbovými chorobami. Široce rozšířené houby jako *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Cylindrocarpum* a *Botrytis* způsobují velké ztráty sazenic v lesních školkách a speciálně vyvinutý kmen *B. cepacia* potlačuje růst těchto hub u různých druhů jehličnanů [22].

ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývá rodem *Burkholderia*, komplexu BCC. Rod sám o sobě nemá příliš dlouhou historii, byl zaveden v roce 1992, kdy byla *B. cepacia* na základě analýzy genomu přerazena z rodu *Pseudomonas*.

Identifikace samotné *B. cepacia* je na základě biochemických vlastností složitá, hlavně protože přísluší do komplexu bakterií, které jsou si vlastnostmi velmi podobné, ale geneticky se liší. Z toho důvodu je jednodušší identifikovat *B. cepacia* jinými metodami, než je testování biochemických vlastností.

Rezistence *B. cepacia* vůči různým antibiotikům představuje problém v léčbě infekcí u pacientů s cystickou fibrózou a imunokompromitovaných pacientů. V obou případech může neléčená infekce skončit smrtí pacienta.

I přes rizika pro pacienty s cystickou fibrózou a oslabené pacienty by bylo vhodné využití tohoto bakteriálního druhu v zemědělství. Díky svému metabolismu dokáže využívat pesticidy jako zdroj uhlíku, také podporuje růst plodin a působí jako inhibitor růstu hub, které by jinak napadaly zemědělské plodiny a stromy.

POUŽITÁ LITERATURA

1. DEPOORTER, Eliza, Matt J. BULL, Charlotte PEETERS, Tom COENYE, Peter VANDAMME a Eshwar MAHENTHIRALINGAM. Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, **100**(12), 5215-5229 [cit. 2023-02-26]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-016-7520-x
2. GOVAN, J. R. W., J. E. HUGHES a P. VANDAMME. Burkholderia cepacia: medical, taxonomic and ecological issues. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 1996, **45**(6), 395-407 [cit. 2022-12-09]. ISSN 0022-2615. Dostupné z: doi:10.1099/00222615-45-6-395
3. VANDAMME, Peter a Peter DAWYNDT. Classification and identification of the Burkholderia cepacia complex: Past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2011, **34**(2), 87-95 [cit. 2023-02-28]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi: 10.1016/j.syapm.2010.10.002
4. LIPUMA, John J. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2010, **23**(2), 299-323 [cit. 2023-02-28]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00068-09
5. SCOFFONE, Viola C., Laurent R. CHIARELLI, Gabriele TRESPIDI, Massimo MENTASTI, Giovanna RICCARDI a Silvia BURONI. Burkholderia cenocepacia Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, **8**(1592), 13 [cit. 2023-02-28]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.01592
6. GANESH, Pitchaipillai Sankar, Sivakumar VISHNUPRIYA, Jamuna VADIVELU, Vanitha MARIAPPAN, Kumutha M. VELLASAMY a Esaki M. SHANKAR. Intracellular survival and innate immune evasion of Burkholderia cepacia: Improved understanding of quorum sensing-controlled virulence factors, biofilm, and inhibitors. *Microbiology and Immunology* [online]. 2019, **64**(2), 87-98 [cit. 2023-05-06]. ISSN 0385-5600. Dostupné z: doi:10.1111/1348-0421.12762
7. NELSON, James W., Sarah L. BUTLER, Deborah KRIEG a John R.W. GOVAN. Virulence factors of Burkholderia cepacia. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* [online]. 1994, **8**(2), 89-97 [cit. 2023-02-23]. ISSN 09288244. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-695X.1994.tb00430.x

8. TOMICH, Mladen, Adam GRIFFITH, Christine A. HERFST, Jane L. BURNS a Christian D. MOHR. Attenuated Virulence of a Burkholderia cepacia Type III Secretion Mutant in a Murine Model of Infection. *Infection and Immunity* [online]. 2003, **71**(3), 1405-1415 [cit. 2023-05-08]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.71.3.1405-1415.2003
9. COENYE, Tom a Peter VANDAMME. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* [online]. 2003, **5**(9), 719-729 [cit. 2023-05-10]. ISSN 1462-2912. Dostupné z: doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00471.x
10. *Burkholderia cepacia selective agar*. USA, 2007. Dostupné také z: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/IFU1245.pdf>
11. LANDES, Nehemiah J., Hannah N. LIVESAY, Fran SCHAEFFER, Pam TERRY, Ernest TREVINO a Alice Schauer WEISSFELD. Burkholderia cepacia: a Complex Problem for More than Cystic Fibrosis Patients. *Clinical Microbiology Newsletter* [online]. 2016, **38**(18), 147-150 [cit. 2023-05-10]. ISSN 01964399. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinmicnews.2016.08.003
12. Burkholderia cepacia. *Microbe canvas* [online]. -: -, - [cit. 2023-05-11]. Dostupné z: <https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-negative-rods/obligate-aerobic-3/oxidase-positive-2/colistin-resistant-4/burkholderia-cepacia.html>
13. JUNG B, HOILAT GJ. MacConkey Medium. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394/>
14. FILA L. Cystická fibróza dospělých [Cystic fibrosis in adults]. *Vnitr Lek*. 2018 Winter;63(11):834-842. Czech. PMID: 29303286.
15. JAKUBEC, MUDr. Petr. Cystická fibróza. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2006, 2006, **8**(5), 235-239 [cit. 2023-05-18]. Dostupné z: https://internimedicina.cz/artkey/int-200605-0007_Cysticka_fibroza.php
16. BURKHOLDER, W.H. Sour skin, a bacterial rot of Onion bulbs. *Phytopathology* [online]. 1950, **vol.40**(no.1), 115-117 [cit. 2023-05-18]. Dostupné z: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19501101355>
17. NIMRI, Laila, Mamuno SULAIMAN a Osama Bani HANI. Community-acquired urinary tract infections caused by Burkholderia cepacia complex in patients with no underlying risk factor. *JMM Case Reports* [online]. 2017, **4**(1), - [cit. 2023-06-29]. ISSN 2053-3721. Dostupné z: doi:10.1099/jmmcr.0.005081

18. *About Antimicrobial resistance* [online]. -: -, 2022 [cit. 2023-05-20]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
19. RHODES, Katherine A. a Herbert P. SCHWEIZER. Antibiotic resistance in Burkholderia species. *Drug Resistance Updates* [online]. 2016, **28**(-), 82-90 [cit. 2023-05-20]. ISSN 13687646. Dostupné z: doi:10.1016/j.drug.2016.07.003
20. FEHLBERG, Lorena Cristina Corrêa, Adriana Gianinni NICOLETTI, Ana Carolina RAMOS, Fernanda RODRIGUES-COSTA, Adriana Pereira DE MATOS a Raquel GIRARDELLO. In vitro susceptibility of Burkholderia cepacia complex isolates: Comparison of disk diffusion, Etest®, agar dilution, and broth microdilution methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. 2016, **86**(4), 422-427 [cit. 2023-05-22]. ISSN 07328893. Dostupné z: doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.015
21. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-6669-0.
22. HOLMES, Alison. Agricultural Use of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia: A Threat to Human Health?. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 1998, **4**(2), 221-227 [cit. 2023-06-09]. ISSN 10806040. Dostupné z: doi:10.3201/eid0402.980209
23. ABDALLAH M, ABDALLAH HA, MEMIS ZA. Burkholderia cepacia complex outbreaks among non-cystic fibrosis patients in the intensive care units: A review of adult and pediatric literature. *Infez Med*. 2018 Dec 1;26(4):299-307. PMID: 30555132.
24. MAZER, Dale M., Carol YOUNG, Linda M. KALIKIN, Theodore SPILKER a John J. LIPUMA. In Vitro Activity of Ceftolozane-Tazobactam and Other Antimicrobial Agents against Burkholderia cepacia Complex and Burkholderia gladioli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2017, **61**(9), e00766-17 [cit. 2023-06-23]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.00766-17
25. KUMAR TRIVEDI, Mahendra. An Effect of Biofield Treatment on Multidrug-resistant Burkholderia cepacia: A Multihost Pathogen. *Journal of Tropical Diseases* [online]. 2015, **03**(03), - [cit. 2023-06-23]. ISSN 2329891X. Dostupné z: doi:10.4172/2329-891X.1000167
26. ZHOU, Juyan, Yunhua CHEN, Setareh TABIBI, Luis ALBA, Elizabeth GARBER a Lisa SAIMAN. Antimicrobial Susceptibility and Synergy Studies of Burkholderia cepacia Complex Isolated from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2007, **51**(3), 1085-1088 [cit. 2023-06-23]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.00954-06

27. ROSE, H., A. BALDWIN, C. G. DOWSON a E. MAHENTHIRALINGAM. Biocide susceptibility of the Burkholderia cepacia complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2009, **63**(3), 502-510 [cit. 2023-06-23]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkn540
28. TRACZEWSKI, M. M. a S. D. BROWN. In Vitro Activity of Doripenem against Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia Isolates from both Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2006, **50**(2), 819-821 [cit. 2023-06-23]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.50.2.819-821.2006
29. DACCÒ, Valeria, Gianfranco ALICANDRO, Alessandra CONSALES, Chiara ROSAZZA, Calogero S. SCIARRABBA, Lisa CARIANI a Carla COLOMBO. Cepacia syndrome in cystic fibrosis: A systematic review of the literature and possible new perspectives in treatment. *Pediatric Pulmonology* [online]. 2023, **58**(5), 1337-1343 [cit. 2023-06-27]. ISSN 8755-6863. Dostupné z: doi:10.1002/ppul.26359
30. DRNKOVÁ, Barbora. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory* [online]. Praha: Grada Publishing, 2019 [cit. 2023-06-27]. Sestra (Grada). ISBN 978-80-271-0693-6. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/mikrobiologie-imunologie-epidemiologie-a-hygiena-1324317/>
31. DEVANGA RAGUPATHI, Naveen Kumar a Balaji VEERARAGHAVAN. Accurate identification and epidemiological characterization of Burkholderia cepacia complex: an update. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [online]. 2019, **18**(1) [cit. 2023-06-28]. ISSN 1476-0711. Dostupné z: doi:10.1186/s12941-019-0306-0
32. CLARK, Andrew E., Erin J. KALETA, Amit ARORA a Donna M. WOLK. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2013, **26**(3), 547-603 [cit. 2023-06-27]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00072-12
33. VOLPATO, Fabiana Caroline Zempulski, Mayana Kieling HERNANDEZ, Daiana de LIMA-MORALES, Priscila Lamb WINK, Daniela de Souza MARTINS, Katia Ruschel Pilger de OLIVEIRA a Afonso Luís BARTH. Evaluation of MALDI-TOF MS System for the Identification and Differentiation of Burkholderia cepacia Complex Species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2022, **65**(-), - [cit. 2023-06-27]. ISSN 1678-4324. Dostupné z: doi:10.1590/1678-4324-2022210572

34. BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
35. SEO, S.-T. a K. TSUCHIYA. PCR-based identification and characterization of Burkholderia cepacia complex bacteria from clinical and environmental sources. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2004, **39**(5), 413-419 [cit. 2023-06-27]. ISSN 0266-8254. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01600.x
36. SHARMA-KUINKEL, Batu K., Thomas H. RUDE a Vance G. FOWLER. Pulse Field Gel Electrophoresis. *The Genetic Manipulation of Staphylococci* [online]. New York, NY: Springer New York, 2016, 2014-02-15, **1373**(-), 117-130 [cit. 2023-06-27]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-3157-6. Dostupné z: doi:10.1007/7651_2014_191
37. *NEFERMtest 24*. Brno, -. Dostupné také z: https://erbarus.com/web-files/instr/MLT00010_NEFERMtest_24_G.pdf
38. MAHENTHIRALINGAM, Eshwar, Jocelyn BISCHOF, Sean K. BYRNE, Christopher RADOMSKI, Julian E. DAVIES, Yossef AV-GAY a Peter VANDAMME. DNA-Based Diagnostic Approaches for Identification of Burkholderia cepacia Complex, Burkholderia vietnamiensis, Burkholderia multivorans, Burkholderia stabilis, and Burkholderia cepacia Genomovars I and III. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2000, **38**(9), 3165-3173 [cit. 2023-06-28]. ISSN 1098-660X. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.38.9.3165-3173.2000