

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Urša DOLINAR

**MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA MEDICINSKO
POMEMBNIH BAKTERIJ IZ RODU *Burkholderia* IN
KOMPLEKSA *Burkholderia cepacia***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Urša DOLINAR

**MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA MEDICINSKO POMEMBNIH
BAKTERIJ IZ RODU *Burkholderia* IN KOMPLEKSA *Burkholderia*
*cepacia***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MOLECULAR IDENTIFICATION OF MEDICALLY IMPORTANT
Burkholderia SPECIES AND SPECIES WITHIN THE *Burkholderia*
cepacia COMPLEX**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih okužb in v Laboratoriju za diagnostiko aidsa in hepatitisov in molekularno mikrobiologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Katjo Seme, dr. med., za somentorja dr. Boštjana Kocjana, univ. dipl. mikr. in za recenzentko prof. dr. Evo Ružić-Sabljić, dr. med.

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

Somentor: dr. Boštjan Kocjan, univ. dipl. mikr.

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ ŽUPANC, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: dr. Boštjan KOCJAN, univ. dipl. mikr.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Urša Dolinar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.61+579.8:577.2.083(043)=163.6
KG medicinska mikrobiologija/cistična fibroza/*Burkholderia*/kompleks *Burkholderia cepacia*/*Burkholderia gladioli*/diagnostične metode/molekularne tehnike/PCR/verižna reakcija s polimerazo
AV DOLINAR, Urša
SA SEME, Katja (mentorica)/KOCJAN, Boštjan (somentor)/ RUŽIČ-SABLJIČ, Eva (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2010
IN MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA MEDICINSKO POMEMBNIH BAKTERIJ IZ RODU *Burkholderia* IN KOMPLEKSA *Burkholderia cepacia*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 77 str., 21 pregl., 15 sl., 61 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI Pri bolnikih s cistično fibrozo (CF) predstavljajo velik problem kronične okužbe dihal. Med najnevarnejše povzročitelje teh okužb uvrščamo bakterije kompleksa *Burkholderia cepacia*. V kompleks *B. cepacia* je vključenih 17 fenotipsko podobnih vrst, ki jih s fenotipskimi metodami ni mogoče ločiti. Natančna opredelitev vrste bakterije iz kompleksa *B. cepacia* je ključnega pomena za ustrezno zdravljenje, saj se vrste kompleksa razlikujejo po patogenosti in sposobnosti prenosa med bolniki. V rutinskih laboratorijih se izvaja identifikacija s kombinacijo selektivnega gojišča in fenotipskih identifikacijskih sistemov, vendar to ne omogoča ločevanja med vrstami kompleksa *B. cepacia*. Namen diplomske naloge je bil zato oblikovati algoritem molekularnih testov, s katerim bo mogoče ločiti vrste znotraj kompleksa *B. cepacia* ter učinkovito ločevati bakterije kompleksa od preostalih nefermentativnih po Gramu negativnih bacilov in ki bo izvedljiv v rutinskem bakteriološkem laboratoriju. V raziskavo smo vključili 14 referenčnih sevov ter 9 izolatov zunanje kontrole EuroCare CF, ki so obsegali vse vrste kompleksa *B. cepacia* in vrsto *Burkholderia gladioli* ter 22 kliničnih izolatov, ki so bili bodisi predhodno fenotipsko opredeljeni kot *B. cepacia* ali so rasli na selektivnem gojišču *Burkholderia cepacia* agar (BCA) oziroma so bili osamljeni iz kužnin bolnikov s cistično fibrozo. Vse izolate smo testirali z dvema komercialnima identifikacijskima sistemoma BBL Crystal E/NF (BD Diagnostic systems) in ID 32 GN (BioMerieux) ter z različnimi protokoli PCR za molekularno identifikacijo teh bakterij. Identifikacija bakterij iz kompleksa *B. cepacia* in *B. gladioli* s komercialnima identifikacijskima sistemoma ni bila zanesljiva, saj ni omogočala identifikacije vseh izolatov kompleksa *B. cepacia*, kot *B. cepacia* je napačno opredelila izolate drugih po Gramu negativnih bakterij in ni omogočala ločevanja med vrstami kompleksa *B. cepacia* ter identifikacije bakterije *B. gladioli*. Na osnovi rezultatov vseh uporabljenih protokolov PCR smo oblikovali algoritem za identifikacijo medicinsko pomembnih bakterij kompleksa *B. cepacia* in bakterije *B. gladioli*, s katerim smo izolate opredelili do nivoja kompleksa s protokolom PCR specifičnim za *B. cepacia* kompleks. Najpogostejše vrste kompleksa *B. cepacia* smo nato opredelili z večkratnim PCR, z vrstno specifičnimi protokoli PCR pa še preostale vrste kompleksa. Če je bilo pomnoževanje izolata s protokolom PCR specifičnim za kompleks *B. cepacia* neuspešno, smo najprej izvedli PCR specifičen za rod *Burkholderia* in v primeru pozitivnega rezultata PCR specifičen za *B. gladioli*. Na ta način smo uspešno identificirali vse izolate vključene v raziskavo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.61+579.8:577.2.083(043)=163.6
CX medical microbiology/cystic fibrosis/*Burkholderia*/*Burkholderia cepacia*
complex/*Burkholderia gladioli*/diagnostic methods/molecular techniques/PCR/
polymerase chain reaction
AU DOLINAR, Urša
AA SEME, Katja (supervisor)/KOCJAN, Boštjan (co-advisor)/ RUŽIČ-SABLJIČ, Eva
(reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2010
TY MOLECULAR IDENTIFICATION OF MEDICALLY IMPORTANT
Burkholderia SPECIES AND SPECIES WITHIN THE *Burkholderia cepacia*
COMPLEX
DT Graduation Thesis (University Studies)
NO XI, 77 p., 21 tab., 15 fig., 61 ref.
LA sl
AL sl/en

AB Chronic respiratory infections represent a severe problem among patients with cystic fibrosis (CF). Members of the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) are important pathogens in CF patients. The Bcc currently consists of 17 genomic species that are phenotypically very similar or even indistinguishable and therefore phenotypic methods can not be used for accurate differentiation among the species. Since there is a distinct difference in pathogenesis and transmission ability among the species belonging to Bcc their accurate identification is very important for treatment and management of the patients with CF. In routine clinical laboratories the identification of Bcc isolates is performed using a combination of selective media and phenotypic identification systems, nevertheless this is not sufficient to precisely distinguish among the species. The aim of our study was to develop an algorithm of molecular tests which can be used in routine bacteriological laboratory and can distinguish among the species of Bcc. In the study were included 14 Bcc reference strains and 9 external quality control (EuroCare CF) isolates and 22 clinical isolates, formerly identified as *B. cepacia* using phenotypic methods. All isolates were tested using two commercially available identification systems BBL Crystal E/NF (BD Diagnostic systems) and ID 32 GN (BioMerieux) and several PCR protocols for molecular identification. Commercial identification systems were not reliable as they did not enable the identification of all *B. cepacia* isolates and did not distinguish among the species of the Bcc species. Furthermore these systems falsely identified some other gram-negative bacteria as *B. cepacia* and were not able to identify *B. gladioli*. After taking all the results gathered from the used PCR protocols into consideration, we developed an algorithm for identification of the majority of medically important Bcc species and *B. gladioli*. Using a Bcc-specific PCR an isolate was placed within the Bcc. The most common Bcc species were afterwards identified using multiplex PCR and species-specific PCR. If we failed to amplify an isolate using Bcc-specific PCR then a *Burkholderia* genus-specific PCR was performed. In case of a positive result a *B. gladioli*-specific PCR was performed. Using this algorithm we successfully identified all isolates included in the study.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 CISTIČNA FIBOZA	3
2.1.1 Bakterijski povzročitelji okužb pri bolnikih s cistično fibrozo	3
2.2 KOMPLEKS <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i>	4
2.2.1 Zgodovinski pregled	6
2.2.2 Morfološke značilnosti	8
2.2.3 Patogenost bakterij kompleksa <i>B. cepacia</i>	8
2.2.3.1 Virulenčni dejavniki	9
2.2.3.2 Mehanizmi večkratne odpornosti	10
2.2.4 Kompleks <i>B. cepacia</i> in cistična fibroza	11
2.2.5 Zdravljenje in preprečevanje širjenja okužb.....	13
2.3 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ KOMPLEKSA <i>B. CEPACIA</i>	13
2.3.1 Fenotipska identifikacija.....	14
2.3.1.1 Selektivna gojišča	14
2.3.1.2 Komercialni identifikacijski sistemi	16
2.3.1.3 Biokemični testi	17
2.3.2 Molekularna identifikacija	18
2.3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	19
2.3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času	21
2.3.2.3 Tipizacija zaporedij multiplih lokusov (MLST).....	22

2.3.3	Identifikacija bakterij kompleksa <i>B. cepacia</i> neposredno iz sputuma	22
2.3.4	Identifikacija nefermentativnih po Gramu negativnih bakterij	23
3	MATERIALI IN METODE	25
3.1	MATERIALI	25
3.1.1	Vzorci za raziskavo	25
3.2	METODE	26
3.2.1	Fenotipska identifikacija	26
3.2.1.1	Osamitev bakterij kompleksa <i>B. cepacia</i>	27
3.2.1.1.1	Krvni agar	27
3.2.1.1.2	MacConkey agar	27
3.2.1.1.3	<i>Burkholderia cepacia</i> agar (BCA)	28
3.2.1.2	Fenotipski identifikacijski sistemi	28
3.2.1.2.1	BD BBL Crystal Identification systems: Enteric/Nonfermenter ID	28
3.2.1.2.2	ID 32 GN	29
3.2.1.3	Biokemični testi	29
3.2.2	Molekularna identifikacija	30
3.2.2.1	Izolacija bakterijske DNA	30
3.2.2.2	Merjenje koncentracije izolirane DNA	31
3.2.2.3	PCR protokoli	31
3.2.2.3.1	<i>B. cepacia</i> kompleks specifični PCR	32
3.2.2.3.2	Večkratni PCR: identifikacija vrst <i>B. cepacia</i> , <i>B. multivorans</i> , <i>B. cenocepacia</i> IIIA, <i>B. cenocepacia</i> IIIB in <i>B. dolosa</i>	34
3.2.2.3.3	Vrstno specifični PCR: identifikacija vrst <i>B. stabilis</i> , <i>B. vietnamiensis</i> , <i>B. dolosa</i> , <i>B. ambifaria</i> , <i>B. anthina</i> , <i>B. pyrrocinia</i>	35
3.2.2.3.4	PCR protokol specifičen za rod <i>Burkholderia</i>	36
3.2.2.3.5	PCR protokol specifičen za <i>B. gladioli</i>	37
3.2.2.3.6	Protokol za dokazovanje gena <i>fur</i>	37
3.2.2.3.7	Pomnoževanje gena 16S rRNA	38
3.2.2.4	Dokazovanje pridelkov PCR	39
3.2.2.4.1	Večkratni PCR	39
3.2.2.4.2	<i>B. cepacia</i> kompleks specifični PCR, PCR specifičen za rod <i>Burkholderia</i> in <i>B. gladioli</i> ter PCR metoda pomnoževanja gena <i>fur</i> in 16S rRNA	40

3.2.2.5	Določanje nukleotidnega zaporedja.....	40
3.2.2.5.1	Čiščenje PCR produktov in določanje koncentracije	41
3.2.2.5.2	Izvedba sekvenčne reakcije	42
4	REZULTATI.....	44
4.1	REZULTATI FENOTIPSKE IDENTIFIKACIJE	44
4.1.1	Osamitev bakterij kompleksa <i>B. cepacia</i>.....	44
4.1.2	Fenotipski identifikacijski sistemi in biokemični testi	47
4.2	REZULTATI MOLEKULARNE IDENTIFIKACIJE	53
4.2.1	<i>B. cepacia</i> kompleks specifični PCR	53
4.2.2	Določanje vrste/genomovarja izolatoma kompleksa <i>B. cepacia</i>.....	54
4.2.2.1	Večkratni PCR: identifikacija vrst <i>B. cepacia</i> , <i>B. multivorans</i> , <i>B. cenocepacia</i> IIIA, <i>B. cenocepacia</i> IIIB in <i>B. dolosa</i>	54
4.2.2.2	Vrstno specifični PCR: identifikacija vrst <i>B. stabilis</i> , <i>B. vietnamiensis</i> , <i>B. dolosa</i> , <i>B. ambifaria</i> , <i>B. anthina</i> , <i>B. pyrrocinia</i>	55
4.2.2.3	Določanje nukleotidnega zaporedja.....	57
4.2.2.4	Protokol za dokazovanje gena <i>fur</i>	57
4.2.3	Identifikacija <i>B. gladioli</i>.....	58
4.2.3.1	PCR protokol specifičen za rod <i>Burkholderia</i>	58
4.2.3.2	PCR protokol specifičen za <i>B. gladioli</i>	58
4.2.4	Molekularni algoritem	59
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	62
5.1	RAZPRAVA.....	62
5.1.1	Fenotipska identifikacija.....	62
5.1.2	Molekularna identifikacija	64
5.2	SKLEPI.....	68
6	POVZETEK.....	69
7	VIRI.....	70

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrste vključene v kompleks <i>Burkholderia cepacia</i> , pogostost povzročanja okužb pri bolnikih s cistično fibrozo in sposobnost prenosa med bolniki ter razvoja t.i. cepacia sindroma in z njim povezanega zmanjšane preživetja (Mahenthiralingam in sod., 2008; Vanlaere in sod., 2008; Vanlaere in sod., 2009)	7
Preglednica 2: Biokemične lastnosti bakterij kompleksa <i>Burkholderia cepacia</i> (Mahenthiralingam in sod., 2008).....	17
Preglednica 3: Seznam referenčnih bakterijskih izolatov.....	25
Preglednica 4: Seznam 22 kliničnih izolatov in 9 izolatov zunanje kontrole vključenih v raziskavo	26
Preglednica 5: Sestava osnove MacConkey II Agar	27
Preglednica 6: Sestava gojišča BCA (<i>Burkholderia cepacia</i> agar)	28
Preglednica 7: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje gena <i>recA</i> bakterij kompleksa <i>Burkholderia cepacia</i> in gena <i>fur</i> vrste <i>Burkholderia pyrrocinia</i> , mesto prileganja oligonukleotidnih začetnikov in pričakovana velikost PCR pridelka (Mahenthiralingam in sod., 2000; Vermis in sod., 2004; Coenye in sod., 2001c; Vandamme in sod., 2002; Lynch in Dennis, 2008).....	32
Preglednica 8: Potek <i>Burkholderia cepacia</i> kompleks specifičnega PCR	33
Preglednica 9: Pogoji vrstno specifičnih PCR za identifikacijo vrst <i>Burkholderia stabilis</i> , <i>Burkholderia vietnamiensis</i> , <i>Burkholderia dolosa</i> , <i>Burkholderia ambifaria</i> , <i>Burkholderia anthina</i> in <i>Burkholderia pyrrocinia</i>	35
Preglednica 10: Pogoji PCR reakcije za identifikacijo bakterij rodu <i>Burkholderia</i> , bakterije <i>Burkholderia gladioli</i> in vseh bakterij	36
Preglednica 11: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje gena <i>fur</i> tarčnih bakterijskih vrst kompleksa <i>Burkholderia cepacia</i> , mesto prileganja oligonukleotidnih začetnikov in pričakovana velikost PCR pridelka (Lynch in Dennis, 2008)	37
Preglednica 12: Pogoji PCR reakcije pomnoževanja gena <i>fur</i> bakterij <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Burkholderia multivorans</i> , <i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA, IIIB in IIID ter <i>Burkholderia vietnamiensis</i>	38
Preglednica 13: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov za sekveniranje gena <i>recA</i> (Mahenthiralingam in sod., 2000).....	42

Preglednica 14: Rezultati identifikacije referenčnih sevov in sevov zunanjih kontrol z identifikacijskima sistemoma BBL Crystal E/NF in ID 32 GN.....	48
Preglednica 15: Rezultati identifikacije kliničnih izolatov z identifikacijskima sistemoma BBL Crystal E/NF in ID 32 GN.....	49
Preglednica 16: Rezultati biokemičnega testiranja referenčnih izolatov in izolatov zunanje kontrole	51
Preglednica 17: Rezultati biokemičnega testiranja kliničnih izolatov.....	52
Preglednica 18: Rezultati identifikacije izolatov referenčnih sevov in izolatov zunanje kontrole z molekularnim algoritmom	56
Preglednica 19: Rezultati identifikacije 7 kliničnih izolatov kompleksa <i>Burkholderia cepacia</i> z molekularnim algoritmom	57
Preglednica 20: Rezultati identifikacije kliničnih izolatov, ki pripadajo rodu <i>Burkholderia</i> , vendar niso del kompleksa <i>B. cepacia</i>	59
Preglednica 21: Rezultati fenotipske in molekularne identifikacije kliničnih izolatov rodu <i>Burkholderia</i>	60

KAZALO SLIK

Slika 1: Prevalenca bakterijskih okužb dihal pri bolnikih s cistično fibrozo (Harrison, 2007).....	4
Slika 2: Ugodni in škodljivi vplivi bakterij kompleksa <i>Burkholderia cepacia</i> (Mahenthiralingam in sod., 2005)	5
Slika 3: Interakcija bakterije <i>Burkholderia cepacia</i> z monoslojem epitelnih celic (A); kontakt bakterije z mikrovili (MV) in endocitoza bakterije (B); znotrajcelične bakterije obdane z membrano (C) (Burns in sod., 1996)	12
Slika 4: <i>Burkholderia multivorans</i> , referenčni sev LMG 13010 (krvni agar, 48h)	45
Slika 5: <i>Burkholderia cepacia</i> , referenčni sev LMG 1222 (krvni agar, 48h).....	45
Slika 6: <i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIB, referenčni sev LMG 18830 (krvni agar, 48h) ...	45
Slika 7: <i>Burkholderia vietnamiensis</i> , referenčni sev LMG 18835 (krvni agar, 48h)	45
Slika 8: <i>Burkholderia gladioli</i> , klinični izolat 1 (K11) (krvni agar, 48h)	46
Slika 9: <i>Burkholderia multivorans</i> , referenčni sev LMG 13010 (MacConkey agar, 48h) ..	46
Slika 10: <i>Burkholderia vietnamiensis</i> , referenčni sev LMG 18835 (<i>Burkholderia cepacia</i> agar, 48h).....	46
Slika 11: <i>Burkholderia gladioli</i> , klinični izolat 7 (K17) (<i>Burkholderia cepacia</i> agar, 48h)	46
Slika 12: Talilna krivulja <i>Burkholderia cepacia</i> kompleks specifičnega PCR (A) in dokaz 1043 bp dolgega odsek gena <i>recA</i> z elektroforezo v gelu (B).	54
Slika 13: Dokaz pridelkov PCR večkratnega PCR z elektroforezo v gelu.....	55
Slika 14: Dokaz pomnoženih odsekov gena <i>fur</i> z vrstno specifičnimi PCR z elektroforezo v gelu.	58
Slika 15: Algoritem molekularnih testov za identifikacijo vrst kompleksa <i>Burkholderia cepacia</i> in <i>Burkholderia gladioli</i>	61

SEZNAM OKRAJŠAV

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih delov (<i>angl. amplified fragment length polymorphism</i>)
AHL	acil-homoserin laktoni
ARDRA	<i>angl. amplified ribosomal DNA restriction analysis</i>
BCA	<i>Burkholderia cepacia</i> agar
BCSA	<i>Burkholderia cepacia</i> selective agar
bp	bazni par
c-AMP	ciklični adenzin monofosfat
CF	cistična fibroza
CFTR	<i>angl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulators</i>
DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>angl. deoxyribonucleic acid</i>)
KI	klinični izolat
LDC	lizin dekarboksilaza
LPS	lipopolisaharid
MLST	tipizacija zaporedij multiplih lokusov (<i>angl. multilocus sequence typing</i>)
ODC	ornitin dekarboksilaza
OFPBL	<i>angl. oxidation-fermentation polymyxin bacitracin lactose agar</i>
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (<i>angl. o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside</i>)
PC agar	<i>angl. Pseudomonas cepacia</i> medium
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. polymerase chain reaction</i>)
RFLP	polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov (<i>angl. restriction fragment length polymorphism</i>)
rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina (<i>angl. ribosomal ribonucleic acid</i>)
rpm	število obratov na minuto (<i>angl. rotation per minute</i>)
RT PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (<i>angl. real-time PCR</i>)
T _m	talilna temperatura (<i>angl. melting temperature</i>)
ZK	zunanja kontrola

1 UVOD

Cistična fibroza (CF) je najpogostejša avtosomno recesivna bolezen z značilnimi znaki bolezni dihalne poti, prebavne cevi in urogenitalnimi težavami pri moških (Borinc Beden in sod., 2008). Pri bolnikih s cistično fibrozo povzročajo bakterijske okužbe dihal slabšanje pljučne funkcije ter povečajo obolevnost in umrljivost bolnikov. Med najpomembnejše povzročitelje teh okužb uvrščamo *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* in bakterije kompleksa *Burkholderia cepacia* (Coenye in sod., 2001a).

Bakterije kompleksa *B. cepacia* so osamljene pri približno 3,5 % bolnikov s cistično fibrozo (Mahenthiralingam in sod., 2008). Pri 20 % z *B. cepacia* koloniziranih bolnikov s cistično fibrozo se razvije t. i. cepacia sindrom, pri katerem se zdravstveno stanje hitro poslabša in se običajno konča s smrtjo bolnika. Bakterije kompleksa *B. cepacia* predstavljajo veliko nevarnost za skupnost bolnikov s cistično fibrozo, saj se prenašajo med bolniki, pridobljeno okužbo z *B. cepacia* pa zaradi neučinkovitosti antibiotične terapije le težko izkoreninimo (McClean in Callaghan, 2009).

Kompleks *B. cepacia* trenutno vključuje 17 ozko sorodnih vrst, ki jih s fenotipskimi metodami ni mogoče identificirati (Spilker in sod., 2009). Natančna opredelitev vrste je ključnega pomena za ustrezno zdravljenje in nadaljnje ukrepe za preprečevanje širjenja bakterij med bolniki, saj se vrste kompleksa *B. cepacia* razlikujejo po patogenosti in sposobnosti prenosa med bolniki (McDowell in sod., 2001). Za bolnike s cistično fibrozo predstavljajo največjo nevarnost epidemični sevi *B. multivorans* in *B. cenocepacia* (Mahenthiralingam in sod., 2005).

Izolacija in identifikacija bakterijskih povzročiteljev okužb spodnjih dihal pri bolnikih s cistično fibrozo ni enostavna. V rutinskih bakterioloških laboratorijih se izvaja identifikacija s kombinacijo selektivnega gojišča, fenotipskih identifikacijskih sistemov in dodatnih biokemičnih testov. Identifikacija bakterij kompleksa *B. cepacia* s fenotipskimi metodami je zamudna, manj zanesljiva, ne omogoča ločevanja med vrstami kompleksa *B.*

cepacia ter lahko identificira nekatere druge nefermentativne po Gramu negativne bakterije kot *B. cepacia* (Coenye in sod., 2001a).

Nesposobnost ločevanja vrst kompleksa *B. cepacia* ter lažno pozitivni in lažno negativni rezultati fenotipskih metod so vodili v razvoj molekularnih metod, ki ponujajo zanesljivejšo, bolj občutljivo in specifično možnost identifikacije bakterij kompleksa *B. cepacia*.

1.1 NAMEN DELA

Molekularne metode pridobivajo vedno večji pomen v identifikaciji bakterij kompleksa *B. cepacia*, saj v primerjavi s klasično bakteriološko diagnostiko dosežajo večjo občutljivost in specifičnost.

Namen diplomske naloge je oblikovati algoritem molekularnih testov, ki bo izvedljiv v rutinskem bakteriološkem laboratoriju in s katerim bo mogoče ločiti vrste znotraj kompleksa *B. cepacia* ter identificirati bakterijo *Burkholderia gladioli*. Predpostavljamo tudi, da bo oblikovani algoritem zanesljivo ločil bakterije kompleksa *B. cepacia* od preostalih nefermentativnih po Gramu negativnih bacilov, ki so lahko tudi prisotni v sputumu bolnikov s cistično fibrozo. Dodatno smo želeli preveriti zanesljivost identifikacije bakterije *B. gladioli* in bakterij kompleksa *B. cepacia* s fenotipskimi identifikacijskimi metodami.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CISTIČNA FIBROZA

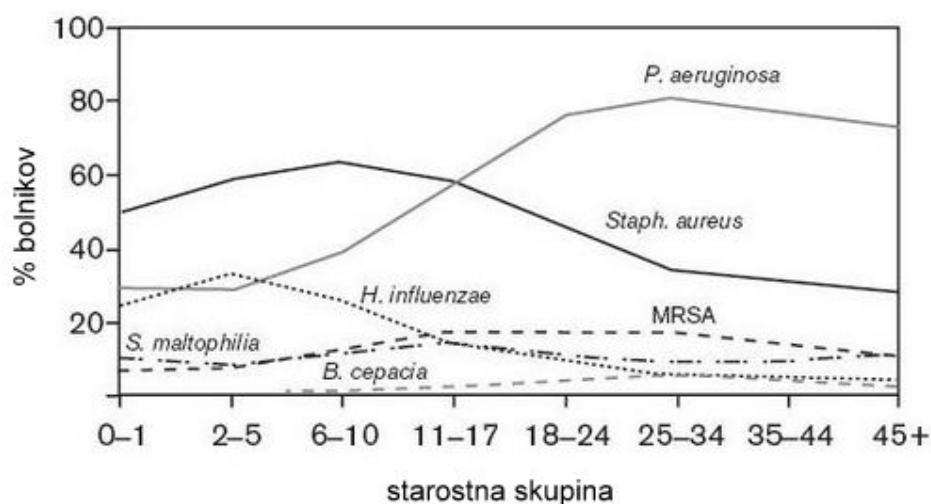
Cistična fibroza ali mukoviscidoza je najpogostejša avtosomno recesivna genetska bolezen (incidenca 1:2500 rojstev), ki prizadene delovanje pljuč, jeter, trebušne slinavke in črevesja. Vzrok bolezni je mutacija gena, ki kodira beljakovino CFTR (angl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulators) oziroma od c-AMP uravnan kloridni kanal na zunanji površini epitelnih celic (Borinc Beden in sod., 2008). Mutacija prizadene prenos kloridnih ionov v epiteliju, posledica tega je pomanjkanje vode v sluznici dihalne poti in zmanjšana učinkovitost odstranjevanja sluzi z migetalkami (Davies in sod., 2007).

2.1.1 Bakterijski povzročitelji okužb pri bolnikih s cistično fibrozo

Glavni vzrok obolenja in umrljivosti pri bolnikih s cistično fibrozo je okvara pljuč, le-ta so prizadeta zaradi kroničnega vnetja in okužb. Za večino bolnikov je značilen vzorec bakterijskih infekcij. V otroštvu sta prva povzročitelja okužb dihal bakteriji *S. aureus* (prizadene 50 % bolnikov s cistično fibrozo) in *H. influenzae* (15 %). Pri odraslih bolnikih s cistično fibrozo je najpogostejši povzročitelj okužb *P. aeruginosa*, ki povzroči kronično okužbo pri 80 % bolnikov (Slika 1) (Hutchison in Govan, 1999; Davies in sod., 2007; Miller in Gilligan, 2003). Visoka obolevnost in umrljivost bolnikov s cistično fibrozo je posledica kroničnih okužb z večkratno odpornimi bakterijami, med katere uvrščamo *P. aeruginosa* in vrste iz rodu *Burkholderia* (Hutchison in Govan, 1999).

Poleg najpogostejših bakterijskih povzročiteljev okužb spodnjih dihal (*S. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*) in bakterij kompleksa *B. cepacia*, povzročajo okužbe dihal pri bolnikih s cistično fibrozo tudi nekatere druge po Gramu negativne bakterije, ki pri zdravih osebah ne povzročajo težav: *Burkholderia gladioli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans*, vrste iz rodu *Ralstonia* in *Pandoraea* (Davies in sod., 2007) ter nekateri virusi (virus influence ter respiratorni sincicijski virus) in *Aspergillus* spp. (Miller in Gilligan, 2003).

Nevarnost za bolnike s cistično fibrozo in imunsko oslABLJENE osebe predstavlja po Gramu negativen bacil *S. maltophilia*, ki lahko povzroči bolnišnične ali iz okolja pridobljene infekcije, bakteriemijo, endokarditis, infekcije dihal, centralnega živčnega sistema in urinarnega trakta, infekcije kože in mehkega tkiva ter gastrointestinalne infekcije (Denton in Kerr, 1998). Osamljena je pri 11 % bolnikov s cistično fibrozo (Slika 1) (LiPuma in sod., 2007). V sputumu bolnikov s cistično fibrozo lahko osamimo tudi *A. xylosoxidans*, ki povzroča okužbo pri 2 do 9 % bolnikov. Večina infekcij z *A. xylosoxidans* je bolnišnično pridobljenih, bakterija je opisana kot povzročiteljica bakteriemije, meningitisa, pljučnice, endokarditisa, peritonitisa in infekcij urinarnega trakta. Pri bolnikih s cistično fibrozo lahko iz sputuma osamimo tudi enterobakterije: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* in *Morganella morganii* ter nekatere bakterijske vrste, ki pri človeku le redko povzročajo bolezni: *Bordetella hinzii*, *Comamonas testosteroni*, *Moraxella oloensis*, *Rhizobium radiobacter*, *Inquilinus limosus* in nekatere vrste rodov *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Herbaspirillum* in *Xanthomonas* (LiPuma, 2003).

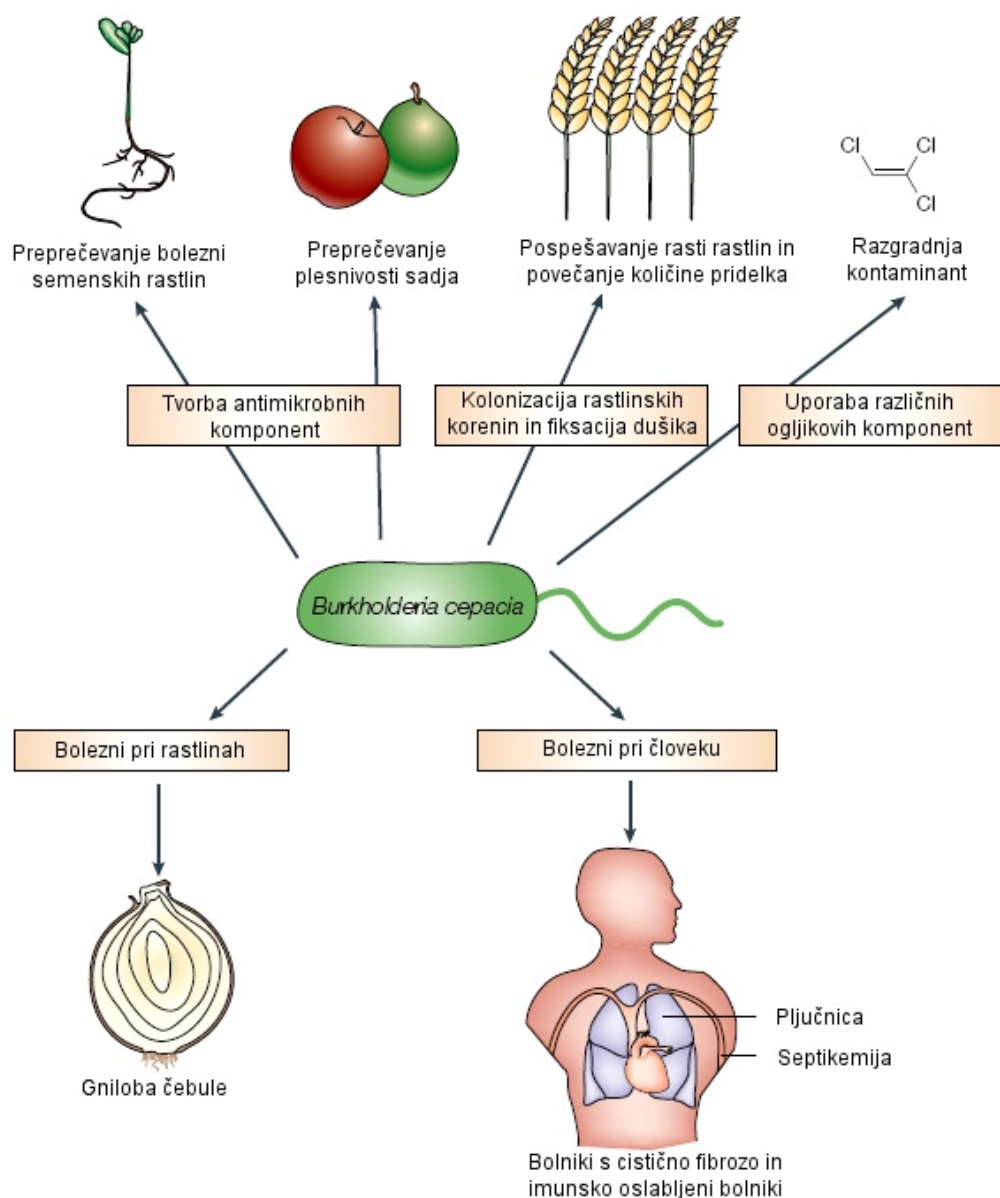


Slika 1: Prevalenca bakterijskih okužb dihal pri bolnikih s cistično fibrozo (Harrison, 2007)

2.2 KOMPLEKS *BURKHOLDERIA CEPACIA*

Bakterijski kompleks *B. cepacia* je sestavljen iz raznolikih bakterij s koristnimi biotehnološki in ekološki lastnostmi (Slika 2) (Mahenthiralingam in sod., 2008). Nekateri sevi imajo sposobnost razgradnje kompleksnih aromatskih spojin, spodbujanja rasti rastlin,

poleg tega pa z antimikrobnimi komponentami varujejo rastline pred številnimi rastlinskimi patogeni: *Alternaria*, *Aphanomyces euteiche*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* (Mahenthiralingam in sod., 2005).



Slika 2: Ugodni in škodljivi vplivi bakterij kompleksa *Burkholderia cepacia* (Mahenthiralingam in sod., 2005)

Kljub vsem koristnim lastnostim bakterije kompleksa *B. cepacia* vzbujajo skrb zaradi razširjenosti v okolju, saj so prisotne v tleh, na rastlinskih koreninah, vlažnih okoljih, igriščih... Predstavljajo nevarnost za bolnike s cistično fibrozo in imunokompromitirane osebe. Do leta 1980 so bile infekcije z bakterijo *B. cepacia* sporadične in večinoma omejene na bolnike v bolnišnicah, ki so bili izpostavljeni kontaminiranim dezinfekcijskim sredstvom ali kontaminirani anestetijski raztopini. *B. cepacia* je opisana kot povzročiteljica infekcij tkiva, respiratornega in urinarnega trakta ter bakteriemije, povezovali pa so jo tudi s septičnim šokom in endokarditisom. Pri bolnikih s cistično fibrozo je bila infekcija z bakterijo *B. cepacia* prvič opisana l. 1984 (Govan in sod., 1996).

2.2.1 Zgodovinski pregled

Bakterijo *Pseudomonas cepacia* je prvi opisal William Burkholder leta 1950 kot rastlinskega patogena, ki povzroča mehko gnilobo čebule. Bakterije rodu *Burkholderia* so bile sprva uvrščene v rod *Pseudomonas* (Chiarini in sod., 2006), imele so številna različna imena: *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas multivorans*, *Pseudomonas kingii* (Mahenthiralingam in sod., 2005).

Na osnovi analize gena 16S rRNA, DNA-DNA homologije, analize profila maščobnih kislin in fenotipskih karakteristik so leta 1992 preimenovali 7 vrst rodu *Pseudomonas* v vrste rodu *Burkholderia*: *B. cepacia*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. caryophilli*, *B. gladioli*, *B. pickettii* in *B. solanacearum* (Coenye in sod., 2001a; Mahenthiralingam in sod., 2005), dve vrsti pa so kasneje prenesli v rod *Ralstonia* (*B. pickettii* in *B. solanacearum*) (Woods in sod., 2006). S podrobnejšo fenotipsko in genotipsko analizo ter biokemičnimi testi so Vandamme in sod. (1997) ugotovili, da vrsta *B. cepacia* vključuje vsaj 5 genetsko različnih vrst, imenovanih genomvarji (I-V). Le-ti so si fenotipsko podobni, razlikujejo se le na nivoju DNA. Genomovar pridobi uradno ime vrste z razvojem diagnostičnih testov, ki omogočajo identifikacijo vrste oziroma genomovarja. Zbir genomovarjev so poimenovali kompleks *B. cepacia* (Woods in sod., 2006; Mahenthiralingam in sod., 2008). Kompleks *B. cepacia* je sprva vključeval vrste *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* (Vandamme in sod., 1997), *Burkholderia cenocepacia* (Vandamme in sod., 2003), *Burkholderia stabilis* (Vandamme in sod., 2000; Coenye in sod., 2001b) in *Burkholderia*

vietnamiensis (Gillis in sod., 1995). V naslednjih petih letih so identificirali še 4 vrste: *Burkholderia dolosa* (Vermis in sod., 2004), *Burkholderia ambifaria* (Coenye in sod., 2001c), *Burkholderia anthina* in *Burkholderia pyrrocinia* (Vandamme in sod., 2002). V zadnjih dveh letih so z analizo MLST opredelili še 8 vrst: *Burkholderia ubonensis*, *Burkholderia latens*, *Burkholderia seminalis*, *Burkholderia diffusa*, *Burkholderia metallica*, *Burkholderia arboris* (Vanlaere in sod., 2008), *Burkholderia contaminans* in *Burkholderia lata* (Vanlaere in sod., 2009). Bakterijske vrste vključene v kompleks *B. cepacia* in njihova sposobnost povzročanja okužb pri bolnikih s cistično fibrozo so navedene v preglednici 1.

Preglednica 1: Vrste vključene v kompleks *Burkholderia cepacia*, pogostost povzročanja okužb pri bolnikih s cistično fibrozo in sposobnost prenosa med bolniki ter razvoja t.i. cepacia sindroma in z njim povezanega zmanjšane preživetja (Mahenthiralingam in sod., 2008; Vanlaere in sod., 2008; Vanlaere in sod., 2009)

Vrsta	Genomovar MLST skupina	Vir izolata	Frekvenca CF (%)	Cepacia sindrom, zmanjšano preživetje	Prenos med bolniki	Vir
<i>B. cepacia</i>	I	CF, okolje	3,1	NP	+	Mahenthira- lingam in sod., 2008
<i>B. multivorans</i>	II	CF, okolje	38,7	+	+	
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	III	CF, okolje	45,6	+	+	
<i>B. cenocepacia</i> IIIB	III	CF, okolje				
<i>B. cenocepacia</i> IIIC	III	okolje				
<i>B. cenocepacia</i> IIID	III	CF				
<i>B. stabilis</i>	IV	CF, okolje	<1	NP	NP	
<i>B. vietnamiensis</i>	V	CF, okolje	5,9	NP	NP	
<i>B. dolosa</i>	VI	CF, okolje	3,8	+	+	
<i>B. ambifaria</i>	VII	CF, okolje	<1	NP	NP	
<i>B. anthina</i>	VIII	CF, okolje	<1	NP	NP	
<i>B. pyrrocinia</i>	IX	CF, okolje	<1	NP	+	
<i>B. ubonensis</i>	X	okolje	NP	NP	NP	Vanlaere in sod., 2008
<i>B. latens</i>	NP	CF				
<i>B. seminalis</i>	NP	CF, okolje				
<i>B. diffusa</i>	NP	CF, okolje				
<i>B. metallica</i>	NP	CF, okolje				
<i>B. arboris</i>	NP	CF, okolje				
<i>B. contaminans</i>	Skupina K	CF, okolje	NP	NP	NP	Vanlaere in sod., 2009
<i>B. lata</i>						

Legenda: NP: ni podatka, CF: cistična fibroza, MLST: angl. multilocus sequence typing

2.2.2 Morfološke značilnosti

Bakterije kompleksa *B. cepacia* uvrščamo v rod *Burkholderia*, ki trenutno vključuje 43 vrst (McClellan in Callaghan, 2009). Rod *Burkholderia* pripada razredu *Betaproteobacteria*, in sicer v družino *Burkholderiaceae* (Palleron, 2005). Taksonomija bakterij kompleksa *B. cepacia* se v zadnjih letih dramatično spreminja. Do nedavnega je kompleks vključeval 9 vrst ali genomovarjev, v zadnjih dveh letih se je število povečalo na 17 fenotipsko podobnih vrst (Spilker in sod., 2009).

Bakterije kompleksa *B. cepacia* so po Gramu negativne ravne ali rahlo ukrivljene palčke velikosti 0,5-1 x 1,5-4 µm. Bakterije rodu *Burkholderia* so gibljive in imajo več polarnih bičkov, ki pospešijo adhenco bakterij na epitelijsko površino. Imajo respiratorni tip metabolizma, vlogo terminalnega sprejemnika elektronov ima kisik. Optimalna temperatura rasti je med 30 in 35 °C, številne vrste so sposobne rasti tudi pri 37 °C ali 40 °C (Palleron, 2005; Govan in sod., 1996).

Bakterije kompleksa *B. cepacia* imajo nenavaden genom, le-ta spada med največje genome po Gramu negativnih bakterij (6 - 9 Mb) in je razdeljen na najmanj 2 replikona. Genom je bogat z insercijskimi sekvencami, pogosto so prisotni tudi plazmidi, transpozoni in bakteriofagi (Vanlaere in sod., 2009).

2.2.3 Patogenost bakterij kompleksa *B. cepacia*

Bakterije kompleksa *B. cepacia* so oportunisti, ki predstavljajo nevarnost za imunsko oslABLJENE osebe, bolnike s cistično fibrozo in bolnike s kronično granulomatozno boleznijo (CGD), pri zdravem človeku pa normalno ne povzročajo bolezni (Mohr in sod., 2001). Bakterije niso del normalne flore človeka, infekcije so tako pridobljene ali v bolnišnici ali iz okolja (Mahenthiralingam in sod., 2005). Pri bolnikih brez cistične fibroze so vrste *B. cenocepacia* (25,6 %), *B. cepacia* (18,9 %), *B. multivorans* (15,6 %), *B. stabilis* in *B. vietnamiensis* najpogostejši povzročitelji okužb. Bakterije lahko osamimo iz krvi, likvorja, kostnega mozga, rane, aspirata treheje, sputuma, sinusov, aspirata trebušne slinavke (Mahenthiralingam in sod., 2008).

2.2.3.1 Virulenčni dejavniki

Bakterije kompleksa *B. cepacia* tvorijo številne virulenčne faktorje, ki povečajo njeno patogenost: hemolizin (hemolitično aktivnost imajo nekateri sevi vrst *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. ambifaria* in *B. pyrrocinia*), proteaze, lipaze, sideroforje in encim katalazo, ki omogoči bakteriji znotrajcelično preživetje. Pomembno vlogo pri vdoru v celico in s tem pri patogenezi imajo bički (Mahenthiralingam in sod., 2005).

Bakterije rodu *Burkholderia* spadajo med najpomembnejše bakterijske proizvajalce lipaz, ekspresija lipaz je največja pri vrsti *B. multivorans* in *B. cenocepacia*. Encim lipaza ima vlogo pri invaziji v pljučne epitelne celice (McClean in Callaghan, 2009). Nekaterе vrste kompleksa *B. cepacia* izdelujejo metaloproteaze (ZmpA, ZmpB) s proteolitično aktivnostjo proti proteinom ekstracelularnega matriksa (kolagen IV, fibronektin) in komponentam imunskega sistema. Pomembno vlogo pri patogenezi bakterij *B. cenocepacia* ima ekstracelularni encim serin proteaza HtrA, ki omogoča izrabo feritina kot vira železa. To je velika prednost za bakterijo, saj je v pljučih bolnikov s cistično fibrozo veliko večja raven feritina kot v pljučih zdravih oseb oziroma oseb brez cistične fibroze (McClean in Callaghan, 2009).

Bakterije kompleksa *B. cepacia* so neodvisno od vrste sposobne tvoriti biofilm v pljučih bolnikov s cistično fibrozo. Bakterijam v biofilmu se poveča odpornost proti ceftazidimu in ciprofloksacinu ter obrambnim mehanizmom gostitelja. V procesu medceličnega signaliziranja in tvorbe biofilma imajo pomembno vlogo signalne molekule acil-homoserin laktoni (AHL). V pljučih bolnikov s cistično fibrozo lahko oblikuje biofilme tudi *P. aeruginosa*. Bakterije kompleksa *B. cepacia* lahko zaznavajo signalne molekule bakterije *P. aeruginosa* in tako v pljučih bolnikov s cistično fibrozo tvorijo mešane biofilme (Mahenthiralingam in sod., 2005).

Pomembno vlogo pri patogenezi bakterij kompleksa *B. cepacia* ima lipopolisaharid (LPS), ki se po zgradbi oligosaharidnega jedra in lipida A razlikuje od preostalih po Gramu negativnih bakterij (Mahenthiralingam in sod., 2005). Rezultat spremenjene strukture je odpornost proti aminoglikozidom in polimiksinu (Davies in sod., 2007).

Za bolnike s cistično fibrozo predstavljajo največje tveganje epidemični sevi *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* in *B. dolosa*. V zadnjih dveh desetletjih so med populacijo bolnikov s cistično fibrozo povzročili veliko umrljivost trije epidemični sevi bakterije *B. cenocepacia*: ET-12, Midwest in PHDC (Philadelphia-DC) (Mahenthiralingam in sod., 2005). Prenos bakterijskih sevov med bolniki je povezan z virulenčnimi faktorji BCESM (angl. *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker), adhezinom (22-kDa) in t.i. cable-like pilusom, ki je zapisan na genu *cblA* (McDowell in sod., 2004). BCESM sevi predstavljajo velik problem, saj lahko v poteku kronične okužbe nadomestijo *B. multivorans* in povečajo umrljivost. Bakterijski sevi *B. cenocepacia* z izraženim t.i. cable pilusom in adhezinom se vežejo na celični receptor citokeratin 13, katerega izražanje je povečano na epitelnih celicah bolnikov s cistično fibrozo (Mahenthiralingam in sod., 2005).

2.2.3.2 Mehanizmi večkratne odpornosti

Zdravljenje bolnikov okuženih z bakterijami kompleksa *B. cepacia* je težavno, saj so bakterije odporne proti številnim antibiotikom, poleg tega imajo sposobnost razvoja odpornosti med antibiotično terapijo (Speert, 2002). Odpornost proti β -laktamom in kationskim antimikrobnim peptidom je rezultat zmanjšane prepustnosti zunanje membrane in strukture LPS. Odpornost proti β -laktamom je povečana s periplazemskimi β -laktamazami, ki razgradijo β -laktamski antibiotik. Bakterije kompleksa *B. cepacia* so odporne tudi proti kloramfenikolu, trimetoprimu in kinolonom (npr. ciprofloksacinu), ki jih bakterije s črpalko aktivno izločajo iz celice. Pri nekaterih bakterijah je prisoten tudi encim dihidrofolat reduktaza (DHFR). Nenavadna zgradba lipopolisaharida zagotavlja odpornost proti aminoglikozidom (gentamicin, tobramicin) in polimiksinu. Bakterijam kompleksa *B. cepacia* se v biofilmu poveča odpornost proti nekaterim antibiotikom, npr. proti ceftazidimu in ciprofloksacinu (Mahenthiralingam in sod., 2005).

2.2.4 Kompleks *B. cepacia* in cistična fibroza

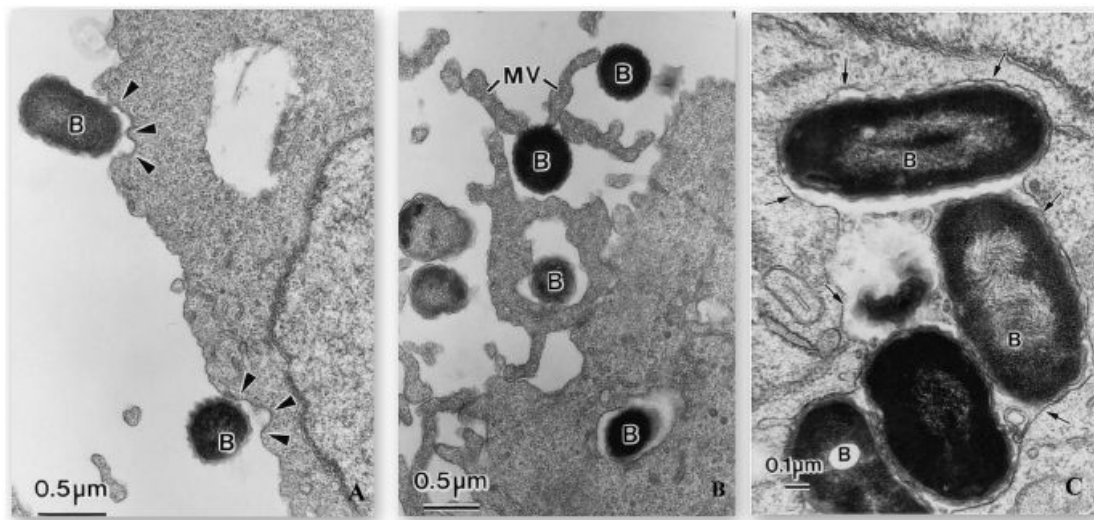
Bakterije kompleksa *B. cepacia* povzročajo okužbo pri približno 3,5 % bolnikov s cistično fibrozo. Infekcijo pri bolnikih s cistično fibrozo lahko povzročijo vse vrste kompleksa *B. cepacia*, z izjemo *B. cenocepacia* IIIC (Mahenthiralingam in sod., 2008; Drevinek in sod., 2008). Najpogostejše povzročiteljice okužb pri bolnikih s cistično fibrozo so vrste *B. cenocepacia* IIIA, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIB in *B. vietnamiensis* (Mahenthiralingam in sod., 2008). V populaciji bolnikov s cistično fibrozo sta *B. cenocepacia* in *B. multivorans* povzročiteljici 80 % okužb (LiPuma, 2003), njuna prevalenca se razlikuje po geografskih regijah: v Severni Ameriki je prevladujoča *B. cenocepacia* in v Evropi *B. multivorans* (McClellan in Callaghan, 2009).

Infekcija z bakterijskimi sevi kompleksa *B. cepacia* je navadno pridobljena pozno v poteku bolezni, poleg tega je bolnik običajno predhodno okužen z bakterijo *P. aeruginosa* (Venturi in sod., 2004). Pri okužbi z bakterijo *B. cepacia* je slabšanje pljučne funkcije hitrejše kot pri s *P. aeruginosa* posredovani okužbi. Preživetje z *B. cepacia* okuženih bolnikov s cistično fibrozo je v primerjavi s celotno populacijo bolnikov s cistično fibrozo krajše skoraj za desetletje (Zuckerman in Seder, 2007). Ko je bolnik koloniziran z bakterijo, je le-to težko izkoreniniti (Mohr in sod., 2001), resnost bolezni pa je pri bolnikih zelo različna, tudi pri tistih, ki so inficirani z istim sevom *B. cepacia* (Speert, 2002). Okužba lahko poteka asimptomatsko, s postopnim slabenjem pljučne funkcije ali kot sistemska okužba (Davies in sod., 2007). Bakterije kompleksa *B. cepacia* predstavljajo resen problem v populaciji bolnikov s cistično fibrozo iz več vzrokov:

- Pri okoli 20 % z bakterijo *B. cepacia* okuženih bolnikov s cistično fibrozo se lahko razvije t. i. cepacia sindrom, pri katerem se zdravstveno stanje bolnika hitro poslabša (Speert, 2002; Mahenthiralingam in sod., 2001). Bakterije povzročijo sistemska okužba, endotoksični šok, večorgansko odpoved (Davies in sod., 2007) in se konča v 62 do 100 % s smrtjo bolnika (Saiman in Siegel, 2004).
- Bakterijska odpornost proti antibiotikom in neučinkovitost antibiotičnega zdravljenja (Davies in sod., 2007).

- Prenos bakterij kompleksa *B. cepacia* (*B. cenocepacia* in *B. multivorans*) je med bolniki s cistično fibrozo možen z direktnim kontaktom, s kontaminiranim predmetom ali aerosolno (McClellan in Callaghan, 2009; Mahenthiralingam in sod., 2005). Prenos je odvisen od bakterijskega seva, vedenja bolnika, preventivnih ukrepov, uporabe kontaminiranih terapevtskih sredstev (Davies in sod., 2007). Skrb povzroča tudi prenos bakterij kompleksa *B. cepacia* med bolnikom s cistično fibrozo ter osebo brez cistične fibroze (Jones in sod., 2004).

Pri bolnikih s cistično fibrozo so spodnja dihalna dovzetnejša za bakterijske okužbe zaradi nepravilnega mukociliarnega delovanja, zmanjšanega izločanja mucina in povečane dostopnosti bakterij do receptorjev na površini epitelialnih celic (Davies in sod., 2007). *B. cepacia* se pritrdi na epitelne celice z vezavo na proteinske in glikolipidne receptorje (Slika 3A). Temu sledi vdor bakterije v epitelne celice (Slika 3B), mehanizem vdora se razlikuje med vrstami kompleksa *B. cepacia*: (i) vdor biofilma; (ii) prerazporeditev citoskeleta; (iii) uničenje celice in prodor bakterij skozi epitelij. Znotrajcelično preživetje omogoča bakteriji *B. cepacia*, da uide obrambnim mehanizmom gostitelja (Slika 3C) (McClellan in Callaghan, 2009).



Slika 3: Interakcija bakterije *Burkholderia cepacia* z monoslojem epitelialnih celic (A); kontakt bakterije z mikrovili (MV) in endocitoza bakterije (B); znotrajcelične bakterije obdane z membrano (C) (Burns in sod., 1996)

Bakterija lahko uspešno vdre in preživi tudi v pljučnih makrofagih (Martin in Mohr, 2000). K povečanju umrljivosti bolnikov s cistično fibrozo pripomore tudi sposobnost bakterij, da prodrejo skozi epitelij v krvni obtok in povzročijo bakteriemijo (McClean in Callaghan, 2009).

2.2.5 Zdravljenje in preprečevanje širjenja okužb

Pri premagovanju okužbe je antibiotična terapija pogosto neučinkovita, saj imajo bakterije številne mehanizme rezistence, poleg tega lahko antibiotik sproži razvoj inducirane rezistence (Miller in Gilligan, 2003). Pred uvedbo antibiotičnega zdravljenja je potrebno pridobiti rezultate antibiograma. Pri bolnikih s kronično okužbo uvedemo kombinirano antibiotično zdravljenje, ki vključuje antibiotike različnih skupin z dokazanim sinergističnim učinkom (Speert, 2002). Bakterijski sevi, ki niso bili predhodno izpostavljeni antibiotičnemu zdravljenju, so pogosto občutljivi na piperacilin, piperacilin-tazobaktam, cefoperazon, ceftazidim, kloramfenikol in trimetoprim-sulfametoksazol. Po antibiotični terapiji osamljeni sevi so pogosto odporni proti vsem znanim antibiotikom (Miller in Gilligan, 2003).

Pridobljeno okužbo z bakterijam kompleksa *B. cepacia* je skoraj nemogoče izkoreniniti, zato je ključnega pomena preprečevanje širjenja okužb z *B. cepacia* (Miller in Gilligan, 2003). Prenos bakterije *B. cepacia* preprečujemo s strogim pravilom ločevanja z *B. cepacia* okuženih bolnikov s cistično fibrozo od neokužene populacije bolnikov s cistično fibrozo. Okužene bolnike ločujemo tudi od preostalih z *B. cepacia* inficiranih bolnikov s cistično fibrozo, saj lahko bolj virulenten sev nadomesti primarni, manj patogeni sev (Saiman in Siegal, 2004). Kritičnega pomena je pravilna identifikacija bakterij kompleksa *B. cepacia*, saj lažno negativni rezultat predstavlja grožnjo za celotno populacijo bolnikov s cistično fibrozo (Miller in Gilligan, 2003).

2.3 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ KOMPLEKSA *B. CEPACIA*

Izolacija in identifikacija bakterijskih povzročiteljev okužb spodnjih dihal pri bolnikih s cistično fibrozo ni enostavna. Viskoznost izkašljanega ali inducirane sputuma

predstavlja oviro pri izolaciji bakterijskega povzročitelja. Dodatno težavo pri osamitvi bakterij predstavlja polimikrobna narava okužbe, torej okužbo povzroča hkrati več bakterij z različnimi rastnimi zahtevami. Pogost povzročitelj okužb spodnjih dihal je *P. aeruginosa*, ki lahko na neselektivnih gojiščih preraste po Gramu pozitivne bakterije (*S. aureus*) ter počasi rastoče po Gramu negativne bakterije (*B. cepacia* in *H. influenzae*). Osamitev bakterij *S. aureus*, *H. influenzae* in *B. cepacia* dosežemo z nacepljanjem kliničnega vzorca na selektivna gojišča. Čisto kulturo identificiramo s standardnim biokemičnim testiranjem, komercialno dostopnimi identifikacijskimi sistemi ali molekularnimi metodami (Gibson in sod., 2003).

Pravilna identifikacija vrst kompleksa *B. cepacia* je ključnega pomena za zdravljenje in pravilno ravnanje z okuženimi bolniki. Diagnostične metode za identifikacijo bakterij kompleksa *B. cepacia* morajo omogočati ločevanje med vrstami kompleksa ter učinkovito ločevati bakterije kompleksa *B. cepacia* od preostalih nefermentativnih po Gramu negativnih bacilov (Coenye in sod., 2001a).

2.3.1 Fenotipska identifikacija

V rutinskih laboratorijih se izvaja identifikacija bakterij kompleksa *B. cepacia* s kombinacijo selektivnega gojišča, fenotipskih identifikacijskih sistemov in dodatnih biokemičnih testov: dekarboksilacija lizina in ornitina, β -galaktozidazna aktivnost, redukcija nitrata do nitrita, oksidacija sukroze in adonitola, pozitivna oksidaza, hemoliza, rast pri 42 °C (Mahenthiralingam in sod., 2008). Ta pristop ne omogoča identifikacije vrst kompleksa *B. cepacia*, nesposobnost ločevanja vrst s fenotipskimi metodami pa je vodila v razvoj molekularnih diagnostičnih testov (Mahenthiralingam in sod., 2005).

2.3.1.1 Selektivna gojišča

Rast bakterij kompleksa *B. cepacia* je počasna in zahteva 24 do 72 urno inkubacijo. Detekcija bakterij na krvnem agarju ali MacConkey agarju je otežena, saj jo hitreje rastoče bakterije respiratornega trakta pogosto prerastejo (*P. aeruginosa*, *Staphylococcus* spp.) (Gibson in sod., 2003).

Uporaba selektivnih gojišč je izboljšala izolacijo bakterij kompleksa *B. cepacia*. Selektivna rast zelenih bakterij je zagotovljena z dodatkom komponent, ki preprečujejo rast nezaželenih mikroorganizmov: laktoza, sukroza, polimiksin B, gentamicin, vankomicin. V rutinskih laboratorijih se uporabljajo različna selektivna gojišča: PC agar (*Pseudomonas cepacia* medium), OFPBL agar (oxidation-fermentation polymyxin bacitracin lactose agar) ali BCSA (*Burkholderia cepacia* selective agar) (LiPuma in sod., 2007). Na selektivnih gojiščih za bakterije kompleksa *B. cepacia* lahko porastejo tudi nekatere druge po Gramu negativne bakterije: *B. gladioli*, *Pandoraea* spp. in *Ralstonia* spp. (Palleron, 2005).

PC agar zavira rast nezaželenih po Gramu negativnih bakterij z dodatkom antibiotikov polimiksina B in tikarcilina. Dodatek kristal vijoličnega ter žolčnih kislin inhibira rast po Gramu pozitivnih kokov (enterokoki in stafilokoki). Detekcija bakterij kompleksa *B. cepacia* je pospešena z dodatkom piruvata, pri metabolizmu katerega nastanejo alkalni produkti, posledica tega je dvig pH gojišča in sprememba barve indikatorja v rožnato (BioMérieux, 2009).

OFPBL je selektivno gojišče, ki inhibira rast po Gramu pozitivnih mikroorganizmov in bakterij rodu *Neisseria* z dodatkom polimiksina B in bacitracina. Detekcijo bakterij kompleksa *B. cepacia* pospešuje indikator bromtimol modro, ki spremeni barvo ob nastanku kislinskih produktov pri razgradnji laktoze. Kolonije *B. cepacia* so obarvane rumeno (BioMérieux, 2009).

BCSA medij vsebuje gentamicin, polimiksin B, vankomicin, kristal vijolično, sukrozo ter indikator fenol rdeče za lažjo detekcijo bakterij kompleksa *B. cepacia* (BioMérieux, 2009). Dodatek polimiksina v gojišče BCSA ne vpliva na rast bakterij kompleksa *B. cepacia*, prepreči pa rast nekaterih nefermentativnih po Gramu negativnih bacilov, koagulaza negativnih stafilokokov in kvasovk.

Bakterije kompleksa *B. cepacia* dobro rastejo na vseh treh selektivnih gojiščih. BCSA zavira rast večine po Gramu negativnih bakterij in je med tremi selektivnimi gojišči najkvalitetnejši. Problematična je bakterija *S. maltophilia*, saj tako kot *B. cepacia* uporablja sukrozo in lizin in ima občasno šibko pozitivno oksidazo (Henry in sod., 1997).

2.3.1.2 Komercialni identifikacijski sistemi

Fenotipska identifikacija s komercialnimi sistemi ne omogoča ločevanja med vrstami kompleksa *B. cepacia* in dodatno lahko opredeli nekatere nefermentativne po Gramu negativne bakterije kot bakterije kompleksa *B. cepacia*: *B. gladioli*, *Ralstonia pickettii*, *Alcaligenes* spp., *Pseudomonas* spp., *S. maltophilia*, *Flavobacterium* spp. in *Chryseobacterium* spp. (Mahenthiralingam in sod., 2005; Coenye in sod., 2001a).

V rutinskih bakterioloških laboratorijih se za diagnostiko okužb z bakterijami *B. cepacia* uporabljajo različni komercialno dostopni sistemi: Vitek GNI Plus (BioMerieux, Lyon, Francija), Vitek GNI (BioMerieux, Lyon, Francija), MicroScan Conventional Gram Neg Panel (MicroScan GNP) (Dade International, West Sacramento, ZDA), API 20NE (BioMerieux, Lyon, Francija), RapID NF Plus (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, ZDA), MicroScan Rapid Neg ID (Dade International), Crystal Enteric/Nonfermenter ID (Crystal E/NF) (BD Diagnostic Systems, Sparks, ZDA), Remel Uni-N/F Tek Plate and N/F Screen (Remel N/F system) (Remel, Lenexa, ZDA) in Sherlock gas-liquid chromatography (Sherlock GLC) (MIDI, Inc., Newark, ZDA). Približno 10 % bakterijskih izolatov je s komercialnimi sistemi napačno identificiranih kot bakterija *B. cepacia*. Večino nepravilno identificiranih bakterij (70 %) uvrščamo med nefermentativne po Gramu negativne vrste, ki kolonizirajo dihalne poti bolnikov s cistično fibrozo.

Najpogosteje je napačno identificirana *B. gladioli*, saj večina komercialnih sistemov ne vključuje te bakterije v bazi podatkov, izjema sta sistema: RapidID NF Plus Plus (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, ZDA) in Crystal Enteric/Nonfermenter ID (BD Diagnostic Systems, Sparks, ZDA) (Shelly in sod., 2000).

Identifikacija s komercialnimi identifikacijskimi sistemi ni zanesljiva, potrebna je potrditev rezultata ali z dodatnim biokemičnim testiranjem ali z molekularnimi metodami (LiPuma in sod., 2007).

2.3.1.3 Biokemični testi

S klasičnimi biokemičnimi testi ni mogoče zanesljivo identificirati vrst kompleksa *B. cepacia*, vendar nekatere biokemične karakteristike pripomorejo pri uvrstitvi bakterijskega izolata v kompleks *B. cepacia* ali celo pri nadaljnjemu določanju vrste. Na osnovi biokemičnih testov lahko ločimo vrsti *B. multivorans* in *B. stabilis* od preostalih vrst kompleksa *B. cepacia* (Henry in sod., 2001).

Večina medicinsko pomembnih vrst kompleksa *B. cepacia* ima encim lizin dekarboksilazo, izjema sta vrsti *B. dolosa*, ki encima nima in *B. multivorans*, pri kateri je rezultat LDC testa variabilen. *B. cenocepacia* in *B. stabilis* imata encim ornitin dekarboksilazo, vrsti ločimo s testom hidrolize ONPG (o-nitrofenil-beta-D-galaktopiranozida) (LiPuma in sod., 2007). Preostale biokemične lastnosti so navede v preglednici 2.

Preglednica 2: Biokemične lastnosti bakterij kompleksa *Burkholderia cepacia* (Mahenthiralingam in sod., 2008)

Bakterijska vrsta	Drugo ime	Biokemični test										
		O	BCSA	McC	42 °C	LDC	ODC	ONP G	NO ₃	hem	pig	Ž
<i>B. cepacia</i>	I	v(+)	+	v(+)	v(-)	+	v(-)	+	-	-	v(r)	v(-)
<i>B. multivorans</i>	II	+	+	+	+	v(-)	-	+	+	-	-	-
<i>B. cenocepacia</i>	III	+	+	v(+)	v(+)	+	v(+)	+	v(-)	-	v(rj)	v(-)
<i>B. stabilis</i>	IV	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	V
<i>B. vietnamiensis</i>	V	+	+	v(+)	+	+	-	+	v(+)	v(β)	-	-
<i>B. dolosa</i>	VI	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>B. ambifaria</i>	VII	+	+	+	v(+)	+	-	+	v(+)	v(β)	-	+
<i>B. anthina</i>	VII	+	+	+	v(-)	v(+)	-	v(+)	v(+)	-	-	v(+)
<i>B. pyrrocinia</i>	IX	+	+	+	v	+	+	+	v(+)	v(β)	v(r)	+
<i>B. ubonensis</i>		+	NP	+	v(-)	-	-	-	v(+)	-	-	-
<i>B. latens</i>		+	NP	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>B. seminalis</i>		+	NP	+	-	+	+	+	-	-	r	+
<i>B. diffusa</i>		+	NP	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>B. metallica</i>		+	NP	+	+	+	-	+	-	-	r	+
<i>B. arboris</i>		+	NP	+	-	+	+	+	+	β	sr	+
<i>B. contaminans</i>	Skupina K	+	+	+	+	+	-	+	v(-)	v(β)	v(r)	NP
<i>B. lata</i>		+	+	+	-	+	v	v	v	-	v(r)	NP

Legenda: O: oksidazni test, BCSA: rast na gojišču BCSA (*Burkholderia cepacia* selective agar), McC: rast na MacConkey agarju, 42 °C: rast v tioglikolatnem bujonu pri 42 °C, LDC: lizin dekarboksilaza, ODC: ornitin dekarboksilaza, ONPG: o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid, NO₃: redukcija nitrata, hem: hemoliza na krvnem agarju, pig: tvorba pigmenta (r-rumen, sr-svetlo rumen, rj-rjav), Ž: želatina, NP: ni podatka, +: >90 % pozitivnih izolatov, v: 10–90 % pozitivnih izolatov, -: <10 % pozitivnih izolatov

2.3.2 Molekularna identifikacija

Nesposobnost ločevanja vrst ter lažno pozitivni in lažno negativni rezultati fenotipskih metod so vodili v razvoj molekularnih metod, ki omogočajo ločevanje vrst kompleksa *B. cepacia* ter ločevanje bakterij kompleksa od ostalih nefermentativnih po Gramu negativnih bacilov (Mahenthiralingam in sod., 2005).

Za določanje vrst oziroma genomovarjev so v zadnjem desetletju oblikovali številne molekularne metode, ki temeljijo na pomnoževanju gena 16S rRNA ali 23S rRNA. LiPuma in sod. (1999) so oblikovali oligonukleotidne začetnike za identifikacijo vrst *B. multivorans* in *B. vietnamiensis*. Bakterije kompleksa *B. cepacia* imajo 98,2 % identično zaporedje gena 16S rRNA in razlike v zaporedju ne zadoščajo za identifikacijo ostalih vrst kompleksa *B. cepacia*. Whitby in sod. (2000b) so oblikovali PCR algoritem s katerim so pomnožili vmesno zaporedje med 16S rRNA in 23S rRNA. Algoritem temelji na treh PCR reakcijah z različnimi pari oligonukleotidnih začetnikov in omogoča identifikacijo bakterij *B. multivorans* in *B. vietnamiensis*, ne ločuje pa vrste *B. cenocepacia* in *B. stabilis* od vrste *B. cepacia*. Primerna metoda za ločevanje ozko sorodnih mikroorganizmov je metoda AFLP (polimorfizem dolžin pomnoženih delov; angl. amplified fragment length polymorphism), ki omogoča ločevanje med vrstami kompleksa *B. cepacia*, vendar je izvedba tehnično zahtevna (Coenye in sod., 1999; Vonberg in sod., 2006). Metoda RFLP (polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov; angl. restriction fragment length polymorphism) gena 16S rRNA omogoča opredelitev bakterij do nivoja rodu *Burkholderia*, identifikacija do vrste pa ni zanesljiva (Segonds in sod., 1999). Ti molekularni algoritmi so bili oblikovani za ločevanje prvih petih genomovarjev oziroma vrst kompleksa *B. cepacia*.

Opis novih vrst kompleksa *B. cepacia* je vodil v razvoj novih molekularnih pristopov. Pogosto je za identifikacijo bakterij uporabljena metoda pomnoževanja in z restriktazami razrezanimi fragmenti ribosomalne DNA (ARDRA; angl. amplified ribosomal DNA restriction analysis). Uspešnost ločevanja med vrstami znotraj kompleksa *B. cepacia* je omejena, omogoča pa zanesljivo ločevanje bakterij kompleksa *B. cepacia* od bakterij, ki so lahko tudi prisotne v sputumu bolnika s cistično fibrozo: *B. gladioli*, *R. pickettii*,

Chryseobacterium meningosepticum, *S. maltophilia* in *Comamonas acidovorans* (Mahenthiralingam in sod., 2000). Razlike v zaporedju 16S rRNA ne zadoščajo za ločevanje vseh vrst znotraj kompleksa *B. cepacia*, kar je vodilo v razvoj PCR pristopa, ki temelji na pomnoževanju gena *recA* (Coenye in sod., 2001a). Podobnost gena med vrstami kompleksa *B. cepacia* je 94-95 %. Polimorfizem v zaporedju gena *recA* omogoča ločevanje v sputumu najpogostejše prisotnih vrst kompleksa *B. cepacia* (Mahenthiralingam in sod., 2000).

Mahenthiralingam in sod. (2000) so oblikovali štiri molekularne pristope za identifikacijo vrst kompleksa *B. cepacia*, ki temeljijo na analizi t. i. hišnega gena (angl. housekeeping gene) *recA* in se lahko v diagnostičnem laboratoriju izvajajo posamezno ali v kombinaciji z drugimi pristopi. Oprelitev bakterij do nivoja kompleksa *B. cepacia* dosežemo s specifičnim PCR protokolom za kompleks *B. cepacia*, pri katerem z oligonukleotidnima začetnikoma BCR1 in BCR2 pomnožimo značilen odsek gena *recA*. PCR pridelek lahko pripišemo posamezni vrsti z RFLP analizo z restrikcijskima encimoma *HaeIII* in *MnII*. Enostaven pristop za identifikacijo vrst predstavlja vrstno specifičen PCR s specifičnimi pari oligonukleotidnih začetnikov, s katerimi pomnožimo vrstno značilne odseke gena *recA*. Rezultat diagnostičnega postopka lahko pospešimo z razvojem večkratnega PCR (angl. multiplex PCR). Bakterijsko vrsto lahko identificiramo tudi z metodo določanja nukleotidnega zaporedja gena *recA*.

2.3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je metoda pomnoževanja določenega genomskega odseka, pri kateri v kratkem času pomnožimo želeni gen v velikem številu kopij. Pogoji za uspešno identifikacijo bakterij z metodo PCR je pravilen izbor oligonukleotidnih začetnikov, ki so komplementarni koncemu tarčnega gena, ki ga želimo pomnožiti. Za opredelitev bakterij kompleksa *B. cepacia* se uporabljajo kompleks specifični ter vrstno specifični oligonukleotidni začetniki. Kompleks *B. cepacia* specifična oligonukleotidna začetnika BCR1 in BCR2 se prilegata na 3' oziroma 5' konec gena *recA* in pomnožita fragment velikosti 1043 bp. Oligonukleotidna začetnika BCR1 in BCR2 specifično pomnožita gen *recA* vseh vrst kompleksa *B. cepacia* in nista navzkrižno reaktivna z drugimi po Gramu

negativnimi bacili: *B. gladioli*, *R. pickettii*, *C. meningosepticum*, *S. maltophilia*, *C. acidovorans*, *E. coli* in *P. aeruginosa* (Mahenthiralingam in sod., 2000). Mahenthiralingam in sod. so s poravnavo zaporedij gena *recA* oblikovali pare oligonukleotidnih začetnikov, ki omogočajo identifikacijo vrst *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB, *B. stabilis* ter *B. vietnamiensis* in pomnožijo 492 bp, 714 bp, 378 bp, 781 bp, 647 bp in 378 bp dolg odsek gena *recA*. Za oblikovanje vrstno specifičnih oligonukleotidnih začetnikov so izbrali kratko regijo, ki je bila skupna vsem bakterijam iste vrste, hkrati pa se je zadosti razlikovala od regije preostalih vrst kompleksa *B. cepacia*. Temu je sledilo še oblikovanje oligonukleotidnih začetnikov, specifičnih za vrste *B. dolosa* (Vermis in sod., 2004), *B. ambifaria* (Coenye in sod., 2001c) in *B. anthina* (Vandamme in sod., 2002).

Identifikacija vrste *B. cenocepacia* je ključnega pomena, saj je poleg vrste *B. multivorans* najpogostejša in najnevarnejša povzročiteljica okužb. Vrsta *B. cenocepacia* je razdeljena na štiri *recA* podskupine: IIIA, IIIB, IIIC in IIID. Razdelitev na podskupine oteži identifikacijo, saj z oligonukleotidnimi začetniki, ki pomnožujejo gen *recA* ni mogoče identificirati vseh podskupin vrste *B. cenocepacia*. Na osnovi polimorfizma gena *fur* so Lynch in sod. (2008) za identifikacijo podskupin, ki pri bolnikih s cistično fibrozo povzročajo okužbe (*B. cenocepacia* IIIA, IIIB in IIID), izoblikovali vrstno specifična oligonukleotidna začetnika F in R3, ki pomnožita 337 bp dolg odsek gena *fur*. Lynch in sod. (2008) so poleg oligonukleotidnih začetnikov specifičnih za bakterijo *B. cenocepacia* oblikovali tudi začetne oligonukleotide za pomnoževanje značilnih odsekov gena *fur* vrst *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina* in *B. pyrrocinia*. Oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje gena *fur* vrst *B. stabilis* in *B. anthina* so manj specifični in lahko pomnožijo tudi odsek gena vrst *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. dolosa* ali *B. pyrrocinia*.

Bolezen lahko pri ljudeh poleg bakterij kompleksa *B. cepacia*, povzročajo tudi nekatere druge vrste rodu *Burkholderia*: *B. gladioli*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*. Kompleks *B. cepacia* specifični oligonukleotidni začetniki odpovejo pri identifikaciji teh vrst. Payne in sodelavci (2005) so oblikovali PCR shemo za identifikacijo bakterij rodu *Burkholderia*. Oligonukleotidna začetnika BUR1 in BUR2 pomnožita 869 bp dolg odsek gena *recA*

bakterij rodu *Burkholderia*, vendar nista popolnoma specifična za rod *Burkholderia*, saj lahko navzkrižno reagirata s sevi *Bordetella*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* in *Pandoraea*. Lažno pozitivne rezultate izključi PCR reakcija z oligonukleotidnima začetnikoma BUR3 in BUR4, ki pomnožita kratek odsek znotraj 869 bp velikega fragmenta gena *recA*. V naslednjem koraku lahko s sekveniranjem z oligonukleotidnimi začetniki BUR1 in BUR2 ali BUR3 in BUR4 določimo vrsto.

V zadnjih letih se je pri bolnikih s cistično fibrozo povečalo število okužb dihal z *B. gladioli*, ki jo s komercialnimi identifikacijskimi sistemi ne moremo zanesljivo ločiti od vrst kompleksa *B. cepacia*. Bakterijski izolat iz sputuma testiramo za bakterijo *B. gladioli* v primeru, ko je rod specifični PCR pozitiven za bakterije rodu *Burkholderia*, vendar s kompleks specifičnim PCR izključimo vrste kompleksa *B. cepacia*. Bakterijo *B. gladioli* zanesljivo identificiramo z vrstno specifičnim PCR, pri katerem oligonukleotidna začetnika LP1 in LP4 pomnožita odsek gena 23S rRNA vrste *B. gladioli* (Whitby in sod., 2000b).

2.3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Metoda verižne reakcije v realnem času (RT-PCR; angl. real time PCR) omogoča spremljanje poteka pomnoževanja tarčnega zaporedja in določanje količine PCR pridelka v vsakem ciklu. Prednost metode RT-PCR je v primerjavi s klasično PCR metodo skrajšanje potrebnega časa, saj PCR pridelka ne dokazujemo z elektroforezo v agaroznem gelu. Dokaz PCR pridelkov temelji na merjenju fluorescence, ki jo oddajajo fluorescentna barvila ali s fluorofori označeni kratki oligonukleotidi. Prednost RT-PCR je tudi manjša možnost kontaminacije in visoka ponovljivost (Wong in Medrano, 2005).

Pri bolnikih s cistično fibrozo predstavljajo vrste *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis* in *B. vietnamiensis* 95 % vseh izolatov kompleksa *B. cepacia*. Vonberg in sod. (2006) so za identifikacijo teh vrst izoblikovali PCR protokol z vrstno specifičnimi FRET sondami. Delovanje temelji na principu fluorescentnega resonančnega prenosa energije (FRET; angl. fluorescence resonance energy transfer) med fluoroforom in akceptorjem. S kopičenjem PCR pridelka začne naraščati tudi fluorescenca.

2.3.2.3 Tipizacija zaporedij multiplih lokusov (MLST)

MLST (angl. multilocus sequence typing) je tipizacijska metoda, ki temelji na določanju nukleotidnega zaporedja večjega števila t. i. hišnih genov. Baldwin in sod. (2005) so oblikovali MLST shemo za kompleks *B. cepacia*, ki vključuje analizo nukleotidnega zaporedja 7 genov: *atpD* (ATP synthase beta chain), *gltB* (glutamate synthase large subunit), *gyrB* (DNA gyrase subunit B), *recA* (recombinase A), *lepA* (GTP binding protein), *phaC* (acetoacetyl-CoA reductase) in *trpB* (tryptophan synthase subunit B). MLST metoda sestoji iz pomnoževanja tarčnega dela gena z metodo PCR in analize nukleotidnega zaporedja. Vsakemu zaporedju se pripiše številka in kombinacija števil vseh genov MLST analize nam poda sekvenčni tip (ST) (Jolley in sod., 2004).

MLST analiza postaja postopoma zlati standard za ločevanje vrst in identifikacijo novih vrst kompleksa *B. cepacia* (Drevinek in sod., 2008). Metoda ima velik pomen pri identifikaciji sedmih novih vrst kompleksa *B. cepacia* in pri identifikaciji predhodno napačno opredeljenih bakterij. Poleg tega omogoča MLST analiza preučevanje dinamike populacije, raznolikosti in dogodkov rekombinacije v skupini bakterij kompleksa *B. cepacia* (Spilker in sod., 2009).

2.3.3 Identifikacija bakterij kompleksa *B. cepacia* neposredno iz sputuma

Za diagnostične laboratorije je zelo pomemben razvoj hitre metode, ki v zgolj eni PCR reakciji omogoča detekcijo in ločevanje vrst kompleksa *B. cepacia*. Za direktno detekcijo bakterij *B. cepacia* iz sputuma so oblikovani številni oligonukleotidni začetniki, ki pomnožujejo različna tarčna nukleotidna zaporedja. Whitby in sod. (2000b) so oblikovali začetna oligonukleotida G1 in G2, ki pomnožita zaporedja med 16S in 23S rRNA bakterij *B. cepacia*, *B. cenocepacia* in *B. stabilis*, ne identificirata pa ostalih vrst kompleksa *B. cepacia*.

Direktno detekcijo in identifikacijo bakterij kompleksa *B. cepacia* v sputumu so dosegli McDowell in sod. (2001) z razvojem PCR-RFLP protokola, pri katerem najprej z metodo PCR pomnožimo odsek gena *recA* z oligonukleotidnima začetnikoma BCR1 in BCR2 ter

nato opredelimo bakterije do nivoja vrste z RFLP analizo. Z metodo PCR-RFLP je identifikacija bakterij *B. cepacia* dosežena v 1 dnevu, kar skrajša čas za 48 do 72 ur, ki je potreben za rast bakterij *B. cepacia* na selektivnem gojišču. Vzporedno z direktnim molekularnim pristopom osamimo bakterije na selektivnem gojišču. V primeru negativnega rezultata PCR-RFLP analize, ki je lahko posledica premajhne občutljivosti metode, izvedemo nadaljnjo analizo bakterij poraslih na selektivnem gojišču. Občutljivost metode PCR z oligonukleotidnima začetnikoma BCR1 in BCR2 je 10^6 CFU/g sputuma.

Identifikacija vrst kompleksa *B. cepacia* z analizo PCR-RFLP je hitra in uporabna pri potrditvi rezultata, vendar je ne moremo uporabiti kot edini način za razlikovanje bakterijskih vrst kompleksa *B. cepacia*. PCR produkte obdelamo z restrikcijskimi encimi in dobljene fragmente analiziramo z gelsko elektroforezo. Genomovar oziroma vrsto določimo na osnovi primerjave restrikcijskih profilov z objavljenimi restrikcijskimi profili referenčnih sevov kompleksa *B. cepacia*. Opredelitev vrste ni zanesljiva, saj je interpretacija restrikcijskih profilov subjektivna in že minimalna napaka pri določanju profila lahko vodi v napačno identifikacijo. Napake pri branju RFLP profila so lahko posledica zgostitve fragmentov pri določeni velikosti in šibkejših lis na agaroznem gelu. Vrste kompleksa *B. cepacia* imajo lahko več različnih restrikcijskih profilov, obstaja možnost novih restrikcijskih profilov in restrikcijski profili različnih vrst kompleksa *B. cepacia* so lahko identični, kar še dodatno otežuje identifikacijo z RFLP analizo (Moore in sod., 2002; Mahenthiralingam in sod., 2000).

Moore in sod. (2002) so opisali primer napačne identifikacije vrste pri deklici s cistično fibrozo. Na osnovi restrikcijskega profila gena *recA* so v sputumu določili prisotnost bakterije *B. vietnamiensis*, z metodo določanja nukleotidnega zaporedja pa so identificirali vrsto *B. cenocepacia* IIIB.

2.3.4 Identifikacija nefermentativnih po Gramu negativnih bakterij

Fenotipske lastnosti ne zadoščajo za ločevanje bakterij kompleksa *B. cepacia* od nefermentativnih po Gramu negativnih bakterij: *Cupriavidus* spp., *Pandoraea* spp., *Ralstonia* spp. in *B. gladioli*. Na selektivnem gojišču za bakterije kompleksa *B. cepacia*

lahko porastejo tudi vrste rodu *Ralstonia*: *R. pickettii*, *R. mannitolytica* in *R. insidiosa*. Bakterije rodov *Ralstonia* in *Cupriavidus* so počasi rastoče, ki jih od bakterij kompleksa *B. cepacia* razlikujemo po odsotni lizin dekarboksilazi in β -galaktozidazni aktivnosti ter hitro pozitivni oksidazni reakciji. Zanesljivo lahko bakterije *Ralstonia* spp. in *Cupriavidus* spp. ločimo od rodov *Burkholderia* in *Pandoraea* s PCR metodo pomnoževanja 16S rRNA gena (LiPuma in sod., 2007). PCR metoda je zanesljivo orodje tudi za ločevanje bakterij *Pandoraea* spp. od bakterij rodu *Burkholderia*. Bakterije imajo podoben biokemični profil, rodova se ločita predvsem po prisotni oziroma odsotni β -galaktozidazni aktivnosti (Coenye in sod., 2000; LiPuma in sod., 2007). Velik izziv predstavlja identifikacija vrste *B. gladioli*, ki je pogosto napačno identificirana kot *B. cepacia*, saj številni komercialni sistemi ne vključujejo te vrste v svoji podatkovni bazi (LiPuma, 2003; Shelly in sod., 2000). Podobno kot bakterije kompleksa *B. cepacia* je odporna proti več antibiotikom, razlikuje pa se v odpornosti proti aminoglikozidom, vendar to ni zanesljiv kriterij ločevanja *B. gladioli* od vrst kompleksa *B. cepacia* (LiPuma, 2003).

Pri bolnikih s cistično fibrozo povzroča infekcije tudi *S. maltophilia*, ki jo lahko napačno identificiramo kot *B. cepacia*. Bakterijo lahko osamimo na krvnem ali MacConkey agarju ter jo identificiramo s fenotipskimi komercialnimi sistemi ter biokemičnimi testi, ki vključujejo negativni oksidazni test, oksidacijo glukoze in maltoze, DNazno aktivnost in prisotnost encima lizin dekarboksilaze (Denton in Kerr, 1998). Na *B. cepacia* selektivnem gojišču lahko rastejo tudi nekateri sevi bakterije *A. xylosoxidans*, posledično jo lahko napačno identificiramo kot *B. cepacia*. Od bakterij kompleksa *B. cepacia* se razlikujejo predvsem po močno pozitivni oksidazni reakciji in odsotni β -galaktozidazi in lizin dekarboksilazi (LiPuma in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

V raziskavi smo želeli preveriti zanesljivost identifikacije bakterij kompleksa *B. cepacia* in bakterije *B. gladioli* s fenotipskimi metodami ter na osnovi referenčnih sevov LMG oblikovati algoritem molekularnih testov in z njim uspešno identificirati klinične izolate iz arhivske zbirke Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci za raziskavo

V raziskavo smo vključili 14 referenčnih bakterijskih izolatov pridobljenih iz referenčnega laboratorija Univerze v Gentu (Laboratorium voor microbiologie, Universiteit Gent, Belgium): *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia* IIIA, *Burkholderia cenocepacia* IIIB, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia dolosa*, *Burkholderia pyrrocinia* in *Burkholderia gladioli* (Preglednica 3).

Preglednica 3: Seznam referenčnih bakterijskih izolatov

Referenčni izolat	Vrsta
LMG 1222	<i>Burkholderia cepacia</i>
LMG 13010	<i>Burkholderia multivorans</i>
LMG 16660	
LMG 16775	
LMG 12614	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA
LMG 16656	
LMG 16654	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIB
LMG 18829	
LMG 18830	
LMG 14294	<i>Burkholderia stabilis</i>
LMG 18835	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
LMG 18943	<i>Burkholderia dolosa</i>
LMG 21824	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
LMG 18157	<i>Burkholderia gladioli</i>

V raziskavo smo vključili tudi 20 bakterijskih izolatov iz arhivske zbirke Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, ki so bili bodisi predhodno fenotipsko opredeljeni kot *B. cepacia* ali so rasli na selektivnem gojišču BCA oziroma so bili osamljeni iz kužnin

bolnikov s cistično fibrozo, 9 izolatov zunanje kontrole Euro Care CF (*B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB, *B. vietnamiensis*, *P. pnomenusa*, *A. xylosoxidans* in *I. limosus*) ter 2 bakterijska izolata iz arhivske zbirke laboratorija bolnišnice Golnik, ki sta bila predhodno fenotipsko opredeljena kot *B. cepacia* (Preglednica 4).

Preglednica 4: Seznam 22 kliničnih izolatov in 9 izolatov zunanje kontrole vključenih v raziskavo

Klinični izolat (KI)	Fenotipska opredelitev	Klinični izolat (KI)	Fenotipska opredelitev	Izolati zunanje kontrole (ZK)	Vrsta
KI1	<i>Burkholderia gladioli</i>	KI12	<i>Burkholderia cepacia</i>	ZK1	<i>Burkholderia multivorans</i>
KI2	Nefermentativni po Gramu negativni bacili	KI13	<i>Burkholderia cepacia</i>	ZK2	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA
KI3	Nefermentativni po Gramu negativni bacili	KI14	<i>Burkholderia cepacia</i>	ZK3	<i>Burkholderia cepacia</i>
KI4	<i>Burkholderia cepacia</i>	KI15	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	ZK4	<i>Burkholderia multivorans</i>
KI5	<i>Burkholderia cepacia</i>	KI16	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	ZK5	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
KI6	<i>Burkholderia cepacia</i>	KI17	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	ZK6	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIB
KI7	Nefermentativni po Gramu negativni bacili	KI18	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ZK7	<i>Pandora</i> <i>pnomenusa</i>
KI8	Nefermentativni po Gramu negativni bacili	KI19	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	ZK8	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
KI9	<i>Burkholderia gladioli</i>	KI20	<i>Comamonas testosteroni</i>	ZK9	<i>Inquilinus limosus</i>
KI10	<i>Burkholderia gladioli</i>	KI21	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		
KI11	<i>Burkholderia cepacia</i>	KI22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

3.2 METODE

3.2.1 Fenotipska identifikacija

V prvem delu naloge smo bakterijske izolate fenotipsko opredelil s kombinacijo selektivnega gojišča BCA (*Burkholderia cepacia* agar), dveh komercialnih identifikacijskih sistemov: BD BBL Crystal Identification systems (Becton Dickinson, Sparks, ZDA) in ID 32 GN (BioMerieux®, Lyon, Francija) ter biokemičnih testov: test

redukcije nitrata, hidroliza želatine, prisotnost lizin in/ali ornitin dekarboksilaze, prisotnost β -galaktozidazne aktivnosti, rast pri 42 °C.

3.2.1.1 Osamitev bakterij kompleksa *B. cepacia*

Izolacija bakterij *B. cepacia* je na krvnem agarju ali MacConkey agarju nezanesljiva, saj jo pogosto prerastejo hitreje rastoče bakterije respiratornega trakta (Gibson in sod., 2003). Bakterije kompleksa *B. cepacia* izoliramo na selektivnem gojišču BCA (*Burkholderia cepacia* agar).

3.2.1.1.1 Krvni agar

V 1000 ml destilirane vode smo dodali 40,0 g že pripravljene mešanice Blood Agar Base (srčni ekstrakt 20 g, NaCl 5 g, agar 15 g) (Merck, Darmstad, Nemčija). Nastalo mešanico smo 15 minut avtoklavirali pri 121 °C, dodali 50,0 ml citrirane goveje krvi in jo razlili v petrijevke.

3.2.1.1.2 MacConkey agar

Zatehtali smo 50,0 g osnove MacConkey II Agar (Becton Dickinson, Sparks, ZDA) (Preglednica 5) in jo raztopili v 1000 ml destilirane vode ter premešali. Mešanico smo 15 minut avtoklavirali pri 121 °C in ohlajeno razlili v petrijevke.

Preglednica 5: Sestava osnove MacConkey II Agar

Sestava	Količina
Pepton	17,0 g
Proteozni pepton	3,0 g
Laktoza	10,0 g
Žolčne soli št. 3	1,5 g
NaCl	5,0 g
Agar	13,5 g
Neutral rdeče	0,03 g
Kristal violet	0,001 g

3.2.1.1.3 *Burkholderia cepacia* agar (BCA)

Za pripravo gojišča smo zatehtali 18,25 g osnove (Preglednica 6) ter jo raztopili v 500 ml destilirane vode. Sledilo je petnajst minutno avtoklaviranje pri 121 °C. Raztopino smo nato ohladili na 48-50 °C in ji aseptično dodali dodatek. Mešanico smo dobro premešali in jo razlili v petrijeve plošče.

Preglednica 6: Sestava gojišča BCA (*Burkholderia cepacia* agar)

Sestavine	Količina	Sestavine	Količina
Pepton	5,0 g	Amonijev sulfat	1,0 g
Kvasni ekstrakt	4,0 g	Magnezijev sulfat	0,2 g
Na-piruvat	7,0 g	Amonijev-železo sulfat	0,01 g
KH ₂ PO ₄	4,4 g	Fenol red	0,02 g
Na ₂ HPO ₄	1,4 g	Kristal violet	0,001 g
Žolčne soli	1,5 g	Agar	12 g
Dodatek: <i>Burkholderia cepacia</i> selective supplement (Polymixin B: 75,000 IU, Gentamicin: 2,5 mg, Ticarcilin: 50,0 mg)			

Legenda: IU: international unit

Gojišče je prozorno-rumene barve. Inokulirano gojišče smo inkubirali 48-72 ur pri 37 °C. Po morfologiji sumljive kolonije, ki so spremenile barvo gojišča iz prozorno-rumene v rožnato, smo v naslednjem koraku identificirali s komercialnimi identifikacijskimi sistemi in biokemičnimi testi ali z molekularnimi metodami.

3.2.1.2 Fenotipski identifikacijski sistemi

3.2.1.2.1 BD BBL Crystal Identification systems: Enteric/Nonfermenter ID

Crystal Enteric/Nonfermenter ID je komercialni sistem za identifikacijo večine klinično pomembnih po Gramu negativnih bacilov. Miniaturiziran sistem vključuje 30 prilagojenih klasičnih testov, ki omogočajo zaznavanje fermentativnih in nefermentativnih po Gramu negativnih bakterij. Rezultat testa je 10-mestna identifikacijska koda, ki jo računalniški program pretvori v ime bakterijskega izolata.

S sterilno vatrano palčko smo odvzeli iz krvnega agarja eno večjo kolonijo (premer 2-3 mm) ali 4-5 manjših kolonij enake morfologije. Kolonije smo suspendirali v epruveti z inokulacijsko tekočino in pripravili homogeno suspenzijo testiranega bakterijskega seva. Pripravljeno suspenzijo smo vlili v vdolbinice testnega sistema in osnovo pokrili s pokrovom s testi. Sledila je 18-20 urna inkubacija pri 37 °C. Po inkubaciji smo ovrednotili rezultate posameznih testov. Rezultate testov smo po stolpcih sešteli in dobili 10-mesto identifikacijsko kodo, ki ji je računalniški program pripisal ime bakterijskega izolata. Za pravilno identifikacijo bakterijskega izolata smo izvedli še dva dodatna testa: indol in oksidazno reakcijo.

3.2.1.2.2 ID 32 GN

Sistem vključuje 32 miniaturiziranih asimilacijskih testov in omogoča identifikacijo večine klinično pomembnih po Gramu negativnih bacilov.

S sterilno vatrano palčko smo prenesli nekaj kolonij v 0,85 % NaCl in pripravili homogeno suspenzijo gostote 0,5 McFarlanda. S plastično pipeto smo prenesli 200 µl homogene suspenzije v ampulo z API AUX medijem. Z elektronsko pipeto smo premešali in po 135 µl prenesli v vdolbinice testne ploščice. Ploščico smo pokrili in jo inkubirali 24 do 48 ur pri 29 °C ± 2 °C. Po 24-urni inkubaciji smo odčitali rezultate z avtomatiziranim sistemom ATB Expression. V primeru nezanesljivega rezultata smo inkubacijo podaljšali na 48 ur ali izjemoma do 72 ur (v primeru počasi rastočih bakterij).

3.2.1.3 Biokemični testi

Komercialni identifikacijski sistemi ne omogočajo ločevanja med vrstami kompleksa *B. cepacia*, prav tako lahko kot *B. cepacia* napačno identificirajo *B. gladioli*, vrste rodu *Ralstonia* in *Pandoraea*. Ob identifikaciji bakterijskega izolata kot *B. cepacia*, *B. gladioli*, *Ralstonia* ali *Pandoraea* je potrebno rezultat potrditi z dodatnimi biokemičnimi testi (LiPuma in sod., 2007).

V raziskavo vključene izolate smo poskušali identificirati s klasičnimi biokemičnimi testi, kot so: oksidazni test, test prisotnosti lizin dekarboksilaze, ornitin dekarboksilaze, β -galaktozidaze, test redukcije nitrata, utekočinjenja želatine in rasti pri 42 °C.

Za ugotavljanje sposobnosti razgradnje lizina ali ornitina smo bakterijske izolate cepili v gojišča bogata z lizinom ali ornitinom pokrita s parafinom, ki je preprečeval oksidativno razgradnjo glukoze in peptona. Sprememba barve indikatorja je bila posledica nastanka bazičnih aminov ob razgradnji aminokisline. Sposobnost bakterijskega izolata, da razgrajuje aminokislino triptofan, smo ugotavljali s tvorbo indola. Inokuliran tripsin bujon s triptofanom smo inkubirali 18 do 24 ur. Nastanek indola smo zaznali z dodatkom reagenta p-dimetilaminobenzaldehida, ki reagira z indolovim obročem ter povzroči spremembo barve zgornjega sloja tekočine v rdečo. β -galaktozidazno aktivnost smo testirali s testom ONPG. V 0,25 mL fiziološke raztopine smo pripravili bakterijsko suspenzijo gostote 4 McFarlanda in dodali diagnostično tabletko (Rosco diagnostic). Po prekonočni inkubaciji pri 37 °C smo ugotavljali razvoj rumene oborine, ki je pomenil pozitiven rezultat. Prisotnost proteolitičnih encimov želatinaz smo testirali s testom razgradnje želatine. Če je bakterija tvorila proteolitične encime, ki razgrajujejo želatino, se je disk želatine popolnoma raztopil in nastala je črna oborina. Sposobnost redukcije nitrata v nitrit smo preverjali z inokulacijo gojišča s kalijevim nitratom. Nastali nitrit smo ugotavljali z dodatkom sulfanilne kisline v očetni kislini in N,N-dimetil- α -naftilamin v očetni kislini. Gojišče z bakterijami, ki reducirajo nitrat v nitrit, se je obarvalo rdeče.

3.2.2 Molekularna identifikacija

3.2.2.1 Izolacija bakterijske DNA

Bakterijsko DNA smo izolirali iz čiste kulture z izolacijskim kitom QiaAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija). V sterilno 1,5 ml epruvetko smo odpipetirali 180 μ l ATL pufra (angl. Tissue Lysis Buffer), dodali bakterijsko kulturo s cepilno zanko in 20 μ l proteinaze K ter dobro premešali. Sledila je inkubacija pri temperaturi 56 °C in sicer dokler ni bila bakterijska kultura popolnoma lizirana. Po inkubaciji smo rahlo centrifugirali in s

tem odstranili kapljice s stene epruvetke. Dodali smo 200 µl pufra AL (angl. Lysis Buffer) in vzorce vorteksirali 15 sekund ter jih inkubirali 10 minut pri 70 °C. Po inkubaciji smo jih rahlo centrifugirali in dodali 200 µl etanola (96-100 %). Mešanico smo dobro premešali s 15 sekundnim vorteksiranjem, temu je sledilo rahlo centrifugiranje. Celotni volumen mešanice smo prenesli v zbiralno epruvetko (QIAamp Mini spin column) in jo centrifugirali 1 minuto pri 8000 rpm. Izpirek smo zavrgli in mikrokolono prestavili v novo zbiralno epruvetko in dodali 500 µl pufra AW1 (angl. Wash Buffer 1). Sledilo je enominutno centrifugiranje pri 8000 rpm. Izpirek smo zavrgli in mikrokolono vstavili v novo zbiralno epruvetko, dodali 500 µl pufra AW2 (angl. Wash Buffer 2) ter centrifugirali 3 minute pri 14000 rpm. Mikrokolono smo ponovno prestavili v novo zbiralno epruvetko in jo centrifugirali 1 minuto pri 14000 rpm. S tem smo zagotovili popolno odstranitev pufra za spiranje. Mikrokolono smo prestavili v 1,5 ml epruvetko in dodali 200 µl pufra AE (angl. Elution Buffer). Sledila je enominutna inkubacija pri sobni temperaturi, zatem pa enominutno centrifugiranje pri 8000 rpm. Mikrokolono smo zavrgli, saj smo z dodatkom pufra AE dosegli elucijo DNA, ki je bila vezana na filter. Izolirano DNA smo shranili na -20 °C.

3.2.2.2 Merjenje koncentracije izolirane DNA

Po končani izolaciji smo preverili koncentracijo izolirane DNA s spektrofotometrom NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, ZDA). Napravo smo najprej umerili z AE pufrom. Merilno ročico smo obrisali in nanesli 2 µl vzorca. Računalniški program je analiziral signal in nam podal koncentracijo DNA v vzorcu, vrednost A260 in A280 ter razmerje A260/280.

3.2.2.3 PCR protokoli

Prvi korak pri molekularni identifikaciji bakterijskih izolatov je *B. cepacia* kompleks specifični PCR. Z oligonukleotidnima začetnikoma BCR1 in BCR2 pomnožimo 1043 bp velik fragment gena *recA*. Bakterijskim izolatom s pozitivnim rezultatom določimo vrsto z vrstno specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki, ki pomnožijo značilen odsek gena *recA*

vrst *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria* in *B. anthina* ter oligonukleotidnima začetnikoma F1 in R9, ki pomnožita 237 bp dolg odsek gena *fur* bakterije *B. pyrrocinia* (Preglednica 7). Bakterijskim izolatom kompleksa *B. cepacia* pripišemo vrsto z večkratnim PCR, ki omogoča hkratno detekcijo vrst *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB in *B. dolosa* ali z dodatnimi vrstno specifičnimi PCR reakcijami za *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina* in *B. pyrrocinia*.

Preglednica 7: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje gena *recA* bakterij kompleksa *Burkholderia cepacia* in gena *fur* vrste *Burkholderia pyrrocinia*, mesto prileganja oligonukleotidnih začetnikov in pričakovana velikost PCR pridelka (Mahenthiralingam in sod., 2000; Vermis in sod., 2004; Coenye in sod., 2001c; Vandamme in sod., 2002; Lynch in Dennis, 2008)

Vrsta	Oligonukleotidni začetnik	Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnega začetnika	Tarčni gen	Pozicija vezave oligonukleotidnega začetnika	PCR pridelek (bp)
Kompleks <i>B. cepacia</i>	BCR1	5'-TGACCGCCGAGAAGAGCAA-3'	<i>recA</i>	2-20	1043
	BCR2	5'-CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC-3'		1044-1024	
<i>B. cepacia</i>	BCRG11	5'-CAGGTCGTCTCCACGGGT-3'	<i>recA</i>	112-129	492
	BCRG12	5'-CACGCCGATCTTCATACGA-3'		603-585	
<i>B. multivorans</i>	BCRBM1	5'-CGGCGTCAACGTGCCGGAT-3'	<i>recA</i>	321-339	714
	BCRBM2	5'-TCCATCGCCTCGGCTTCGT-3'		1034-1016	
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	BCRG3A1	5'-GCTCGACGTTCAATATGCC-3'	<i>recA</i>	294-309	378
	BCRG3A2	5'-TCGAGACGCACCGACGAG-3'		671-654	
<i>B. cenocepacia</i> IIIB	BCRG3B1	5'-GCTGCAAGTCATCGCTGAA-3'	<i>recA</i>	228-246	781
	BCRG3B2	5'-TACGCCATCGGGCATGCT-3'		1008-991	
<i>B. stabilis</i>	BCRG41	5'-ACCGGCGAGCAGGCGCTT-3'	<i>recA</i>	361-378	647
	BCRG42	5'-ACGCCATCGGGCATGGCA-3'		100-990	
<i>B. vietnamiensis</i>	BCRBV1	5'-GGGCGACGGCGACGTGAA-3'	<i>recA</i>	84-101	378
	BCRBV2	5'-TCGGCCTTCGGCACCAGT-3'		461-444	
<i>B. dolosa</i>	BCR1	5'-TGACCGCCGAGAAGAGCAA-3'	<i>recA</i>	2-20	135
	G6N	5'-CGAGCGAGCCGGTCGAT-3'		136-120	
<i>B. ambifaria</i>	BCRGC1	5'-GTGCGGTAAACCACGCTG-3'	<i>recA</i>	207-225	810
	BCRGC2	5'-ACCGCAGCCGCACCTTCA-3'		999-1016	
<i>B. anthina</i>	BCRG81	5'-TACGGTCCGGAATCGTCG-3'	<i>recA</i>	193-210	473
	BCRG82	5'-CGCACCACGACATAGAAT-3'		665-648	
<i>B. pyrrocinia</i>	F1	5'-GGCNGAAGACGTCTACCGG-3'	<i>fur</i>	102-120	237
	R9	5'-ATCGCCTGTGGCGGCC-3'		322-338	

3.2.2.3.1 *B. cepacia* kompleks specifični PCR

Reakcijsko mešanico smo pripravili po navodilih QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija). Priprava reakcijske mešanice je potekala v hladnem bloku. Reakcijska mešanica enega vzorca je vsebovala 10 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 0,1 µmol oligonukleotidnega začetnika BCR1 in BCR2 ter sterilno vodo.

Pripravljeni reakcijski mešanici v stekleni kapilari smo dodali 50 ng izolirane bakterijske DNA. Končni volumen reakcijske mešanice je bil 20 µl. Poleg vzorcev smo pripravili tudi pozitivno in negativno kontrolo, v katero smo namesto DNA dodali 2 µl sterilne vode. Po dodatku DNA oziroma vode smo kapilare zaprli, jih prenesli v nosilec in centrifugirali v LC Carousel Centrifuge 2.0 (Roche, Nemčija) pri 3000 rpm. Po centrifugiranju smo nosilec vstavili v napravo LightCycler Instrument 1.5 (Roche Diagnostic, Nemčija).

Pomnoževanje 1043 bp dolgega tarčnega nukleotidnega zaporedja smo izvedli v računalniško vodeni napravi LightCycler 1.5, ki omogoča hkratno spremljanje poteka pomnoževanja in zaznavanje PCR pridelkov v realnem času. PCR reakcija je potekala v štirih korakih (Preglednica 8). Pomnoževanje odseka gena *recA* smo izvedli v 35 temperaturnih ciklih. Vsak cikel je bil sestavljen iz denaturacije DNA, prileganja oligonukleotidnih začetnikov na matrično DNA in sinteze nove verige. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko mešanico inkubirali 15 minut pri 95 °C.

Preglednica 8: Potek *Burkholderia cepacia* kompleks specifičnega PCR

	Temperatura (°C)	Čas (s)	Št. ciklov
Denaturacija	95	900	1
Pomnoževanje	94	15	35
	58	30	
	72	60	
Analiza talilne krivulje	95	0	1
	65	30	
	95	0	
Ohlajanje	40	30	1

PCR reakcija je uspešno potekla, če se je pozitivna kontrola uspešno pomnožila, rezultat pomnoževanja DNA pri negativni kontroli pa je bil negativen. Specifičnost PCR produktov smo preverili z analizo talilne krivulje, ki je potekla v enem ciklu sestavljenem iz štirih inkubacijskih korakov: 0 s pri 95 °C, 30 s pri 65 °C, 0 s pri 95 °C in 30 s pri 40 °C. Vzorce pridelkov RT-PCR smo opredelili kot bakterije kompleksa *B. cepacia* na osnovi vrednosti talilne temperature (T_m , angl. *melting temperature*) pozitivne kontrole, ki je znašala med 90-91 °C.

3.2.2.3.2 Večkratni PCR: identifikacija vrst *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB in *B. dolosa*

Za identifikacijo vrst, ki so najpogostejše prisotne v sputumu bolnikov s cistično fibrozo, smo oblikovali večkratni PCR, ki vključuje pare oligonukleotidnih začetnikov, ki pomnožujejo gen *recA* bakterij *B. cepacia* (492 bp), *B. multivorans* (714 bp), *B. cenocepacia* IIIA (378 bp) in *B. cenocepacia* IIIB (781 bp). Za pomnoževanje gena *recA* različnih vrst kompleksa *B. cepacia* smo v reakcijsko mešanico dodali kombinacijo oligonukleotidnih začetnikov MIX1 (mešanica oligonukleotidnih začetnikov BCRG11, BCRG3A1, BCRG3B1, BCRBM1) in MIX2 (mešanica oligonukleotidnih začetnikov BCRG12, BCRG3A2, BCRG3B2, BCRBM2).

Gen *recA* smo pomnoževali s kompletom Qiagen HotStarTaq Plus DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Nemčija). Za en vzorec smo potrebovali 2,5 µl pufra PCR (10x CoralLoad PCR Buffer), 200 µM dATP, dTTP, dGTP in dCTP, 12,5 pmol/µl mešanice oligonukleotidnih začetnikov MIX1 in MIX2, 0,625 U (enot, angl. unit) encima HotStar Taq Plus DNA polymerase, 50 ng izolirane bakterijske DNA in sterilno vodo do končnega reakcijskega volumna 25 µl.

Pomnoževanje tarčnih nukleotidnih zaporedij je potekalo v aparatu Eppendorf MasterCycler® proS (Hamburg, Nemčija) s 30-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh korakov: 30 s pri 94 °C, 30 s pri 62 °C in 45 s pri 72 °C. Pred začetkom prvega cikla smo reakcijsko zmes inkubirali 15 minut pri 95 °C. Po končanem 30. ciklu je sledilo desetminutno podaljševanje PCR produktov pri 72 °C. Reakcijo smo zaustavili z znižanjem temperature na 4 °C.

Pomnožene odseke gena *recA* smo dokazali z elektroforezo v gelu (Poglavje 3.2.2.4.1) in jim glede na velikost pomnoženega fragmenta pripisali vrsto kompleksa *B. cepacia*.

3.2.2.3.3 Vrsto specifični PCR: identifikacija vrst *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia*

Bakterijske izolate kompleksa *B. cepacia*, ki jim z večkratnim PCR nismo določili vrste, smo poskušali identificirati z vrsto specifičnimi PCR protokoli, s katerimi smo pomnožili odsek gena *recA* vrst *B. stabilis* (647 bp), *B. vietnamiensis* (378 bp), *B. dolosa* (135 bp), *B. ambifaria* (810 bp) in *B. anthina* (473 bp) ter odsek gena *fur* vrste *B. pyrrocinia* (237 bp). Najprej smo izvedli vrsto specifične PCR za bakterije *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* in *B. dolosa*. V primeru negativnega rezultata smo izvedli še nadaljnje vrsto specifične PCR za bakterije *B. ambifaria*, *B. anthina* in *B. pyrrocinia*.

Bakterijsko DNA smo pomnoževali s kompletom SYBR Green PCR Kit. Za en vzorec smo uporabili 10 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 0,1 µmol vrsto specifičnega oligonukleotidnega začetnika (Preglednica 7), 50 ng bakterijske DNA in sterilno vodo do končnega volumna 20 µl.

Bakterijsko DNA smo pomnoževali v računalniško vodeni napravi LightCycler. PCR reakcija je potekala pod pogoji navedenimi v preglednici 9. Bakterijskim izolatom smo na osnovi krivulje pomnoževanja DNA in analize talilne krivulje pripisali vrsto.

Preglednica 9: Pogoji vrsto specifičnih PCR za identifikacijo vrst *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia dolosa*, *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia anthina* in *Burkholderia pyrrocinia*

Vrsta	Oligonukleotidni začetnik		Akt.	T (°C) in čas (s)			Analiza talilne krivulje: T (°C), čas (s)			Tm (°C)	Ohlaj.
	forward	reverse		Denat.	Prileg.	Pom.					
<i>B. stabilis</i>	BCRG41	BCRG42	95 °C 900 s	94 °C	64 °C	72 °C	95 °C	65 °C	95 °C	90	40 °C 30 s
<i>B.vietnamiensis</i>	BCRBV1	BCRBV2		15 s	30 s	45 s	0 s	30 s	0 s	91	
<i>B. dolosa</i>	BCR1	G6N								88	
<i>B. ambifaria</i>	BCRGC1	BCRGC2	95 °C 900 s	94 °C	62 °C	72 °C	95 °C	65 °C	95 °C	ND	40 °C 30 s
<i>B. anthina</i>	BCRG81	BCRG82		15 s	30 s	45 s	0 s	30 s	0 s	ND	
<i>B. pyrrocinia</i>	F1	R9								89	

Legenda: Akt.: faza aktivacije, Denat.: denaturacija, Prileg.: prileganje oligonukleotidnih začetnikov, Pom.: pomnoževanje, Tm: talilna temperatura, Ohlaj.: faza ohlajanja, ND: ni delano

3.2.2.3.4 PCR protokol specifičen za rod *Burkholderia*

Bakterijske izolate, ki niso del kompleksa *B. cepacia* (rezultat kompleks specifičnega PCR je bil negativen) smo pomnožili s parom oligonukleotidnih začetnikov BUR1 (5'-GATCGARAAGCAGTTCGGCAA-3') in BUR2 (5'-TTGTCCTTGCCCTGRCCGAT-3'), ki pomnožita 869 bp dolg odsek gena *recA* bakterij rodu *Burkholderia* (Payne in sod., 2005).

Bakterijsko DNA smo pomnoževali s kitom FastStart High Fidelity PCR System (Roche, Nemčija). Za en vzorec smo potrebovali 2,5 µl pufra PCR (10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer with 18 mM MgCl₂), 200 µM dATP, dTTP, dGTP in dCTP, 0,08 µmol oligonukleotidnega začetnika BUR1 in BUR2, 1,25 enot encima FastStart High Fidelity Enzyme, 50 ng bakterijske DNA ter sterilno vodo do končnega volumna 25 µl.

Pomnoževanje odseka gena *recA* je potekalo v instrumentu Eppendorf MasterCycler® proS s 30-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla (Preglednica 10).

Pridelke PCR smo dokazali z elektroforezo v gelu (Poglavje 3.2.2.4.2). Specifičnost pomnoženih odsekov DNA smo določili s primerjavo njihove velikosti glede na velikost pozitivne kontrole (869 bp).

Preglednica 10: Pogoji PCR reakcije za identifikacijo bakterij rodu *Burkholderia*, bakterije *Burkholderia gladioli* in vseh bakterij

	OZ	Aktivacija	Denaturacija	Prileganje	Pomnoževanje	Končni korak	
Rod <i>Burkholderia</i>	BUR 1 BUR 2	95 °C 120 s 1x	95 °C 30 s	60 °C 30 s	72 °C 60 s	72 °C 420 s 1x	T (°C) Čas (s)
			30x				Št. ciklov
<i>Burkholderia gladioli</i>	LP 1 LP 4	95 °C 120 s 1x	95 °C 30 s	60 °C 30 s	72 °C 60 s	72 °C 420s 1x	T (°C) Čas (s)
			30x				Št. ciklov
Bakterije (16S rRNA)	UNI 2 UNI 5	95 °C 120 s 1x	95 °C 30 s	56 °C 30 s	72 °C 60 s	72 °C 420s 1x	T (°C) Čas (s)
			30x				Št. ciklov

Legenda: OZ – oligonukleotidni začetniki

3.2.2.3.5 PCR protokol specifičen za *B. gladioli*

Bakterijske izolate, ki niso del kompleksa *B. cepacia*, spadajo pa v rod *Burkholderia* smo pomnožili z oligonukleotidnima začetnikoma LP1 (5'-GGGGGGTCCATTGCG-3') in LP4 (5'-AGAAGCTCGCGCCACG-3'), ki sta specifična za bakterijo *B. gladioli* (Whitby in sod., 2000a).

Za pomnoževanje 623 bp dolgega odseka gena 23S rRNA smo uporabili kit FastStart High Fidelity PCR System. Za en vzorec smo potrebovali 2,5 µl pufra PCR (10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer with 18 mM MgCl₂), 200 µM dATP, dTTP, dGTP in dCTP, 0,08 µmol oligonukleotidnega začetnika LP1 in LP4, 1,25 enot encima FastStart High Fidelity Enzyme, 50 ng bakterijske DNA ter sterilno vodo do končnega volumna 25 µl. Pomnoževanje bakterijske DNA je potekalo v instrumentu Eppendorf MasterCycler® proS s 30-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla (Preglednica 10). Pomnožene fragmente gena 23S rRNA smo dokazali z elektroforezo v gelu (Poglavje 3.2.2.4.2).

3.2.2.3.6 Protokol za dokazovanje gena *fur*

Pravilnost in natančnost identifikacije kliničnih izolatov smo preverili z oligonukleotidnimi začetniki, ki pomnožujejo gen *fur* (Preglednica 11).

Preglednica 11: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje gena *fur* tarčnih bakterijskih vrst kompleksa *Burkholderia cepacia*, mesto prileganja oligonukleotidnih začetnikov in pričakovana velikost PCR pridelka (Lynch in Dennis, 2008)

Vrsta	Oligonukleotidni začetnik	Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnega začetnika	Pozicija vezave oligonukleotidnega začetnika	PCR pridelek (bp)
<i>B. cepacia</i>	F1	5'-GGCNGAAGACGTCTACCGG-3'	102-120	117
	R1	5'-TCGAAGTTGCTGCGCGAC-3'	201-218	
<i>B. multivorans</i>	F2	5'-AGCAGAGCCCCGTGCGG-3'	77-93	342
	R2	5'-GGTGGGGGCAGTTTTCGGTG-3'	399-418	
<i>B. cenocepacia</i> IIIA, IIIB, IIID	F	5'-TGACCAATCCGACCGATCTCA-3'	2-22	337
	R3	5'-ATCGCCTGCTGGCGGCTC-3'	21-338	
<i>B. stabilis</i>	F4	5'-CNACCGTCTATCGGTGCTC-3'	155-174	275
	R	5'-TCAGTGCTTGCGGTGGG-3'	412-429	
<i>B. vietnamiensis</i>	F	5'-TGACCAATCCGACCGATCTCA-3'	2-22	261
	R5	5'-CGTGGTGGGAGCCTTCGTTG-3'	243-262	

Za pomnoževanje gena *fur* smo uporabili kit FastStart High Fidelity PCR System. Za en vzorec smo potrebovali 2,5 µl pufra PCR (10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer with 18 mM MgCl₂), 200 µM dATP, dTTP, dGTP in dCTP, 0,08 µmol oligonukleotidnih začetnikov (Preglednica 11), 1,25 enot encima FastStart High Fidelity Enzyme, 50 ng bakterijske DNA in sterilno vodo do končnega volumna 25 µl. Pomnoževanje tarčnega nukleotidnega zaporedja je potekalo v instrumentu Eppendorf MasterCycler® proS s 30-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla (Preglednica 12).

Pridelke PCR smo dokazali z elektroforezo v gelu (Poglavje 3.2.2.4.2) in jim na osnovi velikosti pomnoženega fragmenta DNA pripisali vrsto kompleksa *B. cepacia*.

Preglednica 12: Pogoji PCR reakcije pomnoževanja gena *fur* bakterij *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia* IIIA, IIIB in IIID ter *Burkholderia vietnamiensis*

Vrsta	Oligonukleotidni začetniki		Akt.	T (°C) in čas (s)			Končni korak
	forward	reverse		Denat.	Prileg.	Pomn.	
<i>B. cepacia</i>	F1	R1	95 °C 120s	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C
<i>B. multivorans</i>	F2	R2		30 s	30 s	60 s	420 s
<i>B. stabilis</i>	F4	R					
<i>B. cenocepacia</i> IIIA, IIIB, IIID	F	R3	95 °C 120 s	95 °C	60 °C	72 °C	72 °C
<i>B. vietnamiensis</i>	F	R5		30 s	30 s	60 s	420 s

Legenda: Akt.: faza aktivacije, Denat.: denaturacija, Prileg.: prileganje oligonukleotidnih začetnikov, Pomn.: pomnoževanje

3.2.2.3.7 Pomnoževanje gena 16S rRNA

Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov BCR1 in BCR2 smo preverjali z bakterijskimi izolati *B. gladioli*, *C. meningosepticum*, *C. indologenes*, *P. pnomenusa*, *S. maltophilia*, *I. limosus*, *A. baumannii*, *A. iwoffii*, *A. johnsonii*, *P. aeruginosa* in *C. testosteroni*. Pri omenjenih bakterijskih izolatih naj do pomnoževanja DNA ne bi prišlo in smo jih imeli za "negativne kontrole". Uspešnost izolacije bakterijske DNA smo preverili z univerzalnim parom oligonukleotidnih začetnikov UNI2 (5'-GACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') in UNI5 (5'-CTGATCCGCGATTACTAGCGATTTC-3'), ki pomnožita 1020 bp dolg odsek gena 16S rRNA vseh bakterij (Mahenthiralingam in sod., 2000).

Odsek gena 16S rRNA smo pomnoževali s kompletom FastStart High Fidelity PCR System. Reakcijska mešanica enega vzorca je sestavljena iz 2,5 µl pufra PCR (10x FastStart High Fidelity Reaction Buffer with 18 mM MgCl₂), 200 µM dATP, dTTP, dGTP in dCTP, 0,08 µmol oligonukleotidnega začetnika UNI2 in UNI5, 1,25 enot encima FastStart High Fidelity Enzyme, 50 ng bakterijske DNA in sterilne vode do končnega volumna 25 µl. Pomnoževanje gena 16S rRNA je potekalo v instrumentu Eppendorf MasterCycler® proS s 30-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla (Preglednica 10). Pridelke PCR smo dokazali z elektroforezo v gelu (Poglavje 3.2.2.4.2).

3.2.2.4 Dokazovanje pridelkov PCR

Pridelke PCR *B. cepacia* kompleks specifičnega PCR, večkratnega PCR, *B. gladioli* specifičnega PCR in PCR specifičnega za rod *Burkholderia* ter pomnožene odseke gena *fur* in 16S rRNA smo dokazali z elektroforezo v gelu.

Pridelke PCR smo nanesti na komercialno dostopne gele za večkratno uporabo PCR CheckIT Wide Mini (Elchrom Scientific, Cham, Švica), ki smo jih vstavili v elektroforezno aparaturu SEA 2000® (Elchrom Scientific). Gele v elektroforezni banjici smo prelili z elektroforeznim pufrom [1950 ml dvojno deionizirane vode, 50 ml 40x pufra TAE in 100 µl editijevega bromida (10 mg/ml) (Innogenetics)].

3.2.2.4.1 Večkratni PCR

Pridelke PCR večkratnega PCR smo dokazali z elektroforezo v gelu. V začetno vdolbinico smo nanesti 3,2 µl molekularnega označevalca 100 bp - DNA Molecular Weight Marker XIV (Roche, Nemčija) in 10 µl molekularnega označevalca, ki je sestavljen iz PCR produktov referenčnih izolatov *B. cepacia* (492 bp), *B. multivorans* (714 bp), *B. cenocepacia* IIIA (378 bp), *B. cenocepacia* IIIB (781 bp) in *B. dolosa* (350 bp). Molekularni označevalec 100 bp vsebuje DNA fragmente velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 in 2642 bp. V vdolbinice gela smo nanašali 2 µl PCR produkta.

Elektroforeza je potekala 45 minut pri 25 °C in napetosti med elektrodama 120 V. Po končani elektroforezi smo gel pogledali pod UV svetlobo in ga fotografirali. Specifičnost pridelkov PCR smo določili glede na velikost fragmenta, ki smo jo ocenili s primerjavo velikosti fragmentov molekularnega označevalca 100 bp in označevalca, ki vključuje PCR produkte izbranih vrst kompleksa *B. cepacia*. Glede na velikost pridelka PCR smo bakterijskemu izolatu pripisali vrsto oziroma genomovar.

3.2.2.4.2 *B. cepacia* kompleks specifični PCR, PCR specifičen za rod *Burkholderia* in *B. gladioli* ter PCR metoda pomnoževanja gena *fur* in 16S rRNA

Pridelke PCR smo dokazali z elektroforezo v gelu. V začetno vdolbinico smo vnesli 3,2 µl molekularnega označevalca 100 bp. V ostale vdolbinice smo nanесли mešanico pripravljeno iz 6 µl PCR produkta in 2 µl nanašalnega pufra - Loading Buffer (Fermentas, Vilnius, Litva).

Elektroforeza je potekala 30 minut pri 20 °C in napetosti med elektrodama 120 V. Po končani elektroforezi smo gel pogledali pod UV svetlobo in ga fotografirali. Velikost pridelkov PCR smo ocenili s pomočjo molekularnega označevalca. Specifičnost pridelka PCR pa smo določali s primerjavo njegove velikosti glede na velikost pozitivne kontrole.

Po vsaki elektroforezi smo gel očistili, pridelke PCR smo odstranili z elektroforezo v obratni smeri.

3.2.2.5 Določanje nukleotidnega zaporedja

Za opredelitev bakterijskih izolatov, ki so del kompleksa *B. cepacia*, vendar jim nismo uspeli določiti vrste z vrstno specifičnimi PCR, smo uporabili metodo določanja nukleotidnega zaporedja.

3.2.2.5.1 Čiščenje PCR produktov in določanje koncentracije

Pridelke PCR smo očistili s kitom QIAquick PCR purification (Qiagen, Hilden, Nemčija), s katerim smo odstranili nevgrajene deoksinukleotidtrifosfate, nevezane oligonukleotidne začetnike in encim polimerazo. Čiščenje je potekalo po navodilih proizvajalca in sicer smo enemu volumnu pridelkov PCR dodali 5 volumnov pufru PB. Mešanico smo dobro premešali in jo nanесли v mikrokolono, vloženo v 2 ml zbiralno epruvetko ter jo centrifugirali 2 minuti pri 13000 rpm v centrifugi Rotanta 460 (Hettich AG, Bäch, Švica). Zbiralno epruvetko z izpirkom smo zavrgli ter mikrokolono prenesli v novo zbiralno epruvetko. Dodali smo 0,75 ml pufru PE in centrifugirali 2 minuti pri 13000 rpm. Mikrokolono smo vstavili v novo zbiralno epruvetko in jo zopet centrifugirali 2 minuti. Mikrokolono smo prestavili v 1,5 ml epruvetko in dodali 30 µl pufru EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). Sledilo je dvominutno centrifugiranje, s tem smo dosegli elucijo na filter vezane DNA.

Koncentracijo očiščenih pridelkov PCR smo določili na 1,7 % agaroznem gelu. Agarozni gel smo pripravili iz 0,8 g agaroze v prahu (Agarose for routine use, Sigma-Aldrich, St. Luis, ZDA) in 50 ml 1x TEA pufru (0,04 M Tris-HCl; 0,02 M NaCl; 2mM EDTA; 0,02 M Na-acetat pH=8,3). Raztopino agaroze smo segreli v mikrovalovki do temperature vrelišča. Vroči mešanici smo dodali 5 µl etidijevega bromida (10 mg/mL) (Innogenetics, Gent, Belgija). Raztopino agaroze smo vlili v model z glavničkom in jo postavili v hladilnik za 10 minut. Strjeno agarozo v modelu smo položili v elektroforezno banjico HE 33 Mini Submarine Unit (Hoefler, San Francisco, ZDA) in jo prelili z 1x TAE pufrom.

V vdolbinice smo nanесли mešanico, pripravljeno iz 4 µl očiščenega pridelka PCR in 1 µL nanašalnega pufru - 6x Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas, Vilnius, Litva), v eno vdolbinico pa smo nanесли mešanico 4 µL molekularnega označevalca - High Mass DNA Ladder (Invitrogen, Kalifornija, ZDA) in 1 µl nanašalnega pufru.

Elektroforeza je potekala 50 minut pri sobni temperaturi in napetosti med elektrodama 120 V. Po končani elektroforezi smo gel pogledali pod UV svetlobo in ga slikali. Očiščenim

pridelkom PCR smo določili koncentracijo s primerjavo intenzitete fluorescence DNA vzorcev in intenziteto fluorescence fragmentov z znano koncentracijo DNA molekularnega označevalca.

3.2.2.5.2 Izvedba sekvenčne reakcije

Sekvenčno reakcijo smo izvedli s kompletom Big Dye® Terminator v 1.1 Cyclor Sequencing Kit (Applied Biosystems, Kalifornija, ZDA). Reakcijsko mešanico smo pripravili iz 2 µl sekvenčnega pufra (BigDye® Terminator v 1.1/3.1 Sequencing Buffer), 0,5 µl reakcijske mešanice (Big Dye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit), 0,6 µl ustreznega oligonukleotidnega začetnika (Preglednica 13), 3 do 10 ng očiščenega pridelka PCR ter sterilne vode do končnega volumna 10 µl. Količina dodane DNA je odvisna od dolžine pridelka PCR. Pri velikosti pridelkov PCR med 200 in 500 bp je optimalna količina DNA za sekvenčno reakcijo 3 ng, pri velikosti 500 do 1000 bp 5 ng in pri pridelkih PCR večjih od 1000 bp je optimalna količina 10 ng.

Preglednica 13: Nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih začetnikov za sekveniranje gena *recA* (Mahenthalingam in sod., 2000)

OZ	Zaporedje OZ	Mesto vezave	Velikost produkta (bp)
BCR1	5'-TGACCGCCGAGAAGAGCAA-3'	2-20	1043
BCR2	5'-CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC-3'	1044-1024	
BCR3	5'-GTCGCAGGCGCTGCGCAA-3'	513-530	532 bp, 3' konec gena <i>recA</i> v kombinaciji z oligonukleotidnim začetnikom BCR2
BCR4	5'-GCGCAGCGCCTGCGACAT-3'	528-511	527 bp, 5' konec gena <i>recA</i> v kombinaciji z oligonukleotidnim začetnikom BCR1

Legenda: OZ – oligonukleotidni začetnik

Sekvenčna reakcija s posameznim oligonukleotidnim začetnikom se je pričela z enominutno inkubacijo reakcijske mešanice pri 96 °C. Začetni inkubaciji je sledilo 15-kratno ponavljanje temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh korakov: denaturacije (10 s pri 96 °C), prileganja oligonukleotidnih začetnikov (5 s pri 50 °C) in pomnoževanja DNA (75 s pri 60 °C); petkratno ponavljanje temperaturnega cikla: 10 s pri 96 °C, 5 s pri 50 °C in 90 s pri 60 °C; ter petkratno ponavljanje temperaturnega cikla: 10 s pri 96 °C, 5 s pri 50 °C in 2 minuti pri 60 °C. Reakcijo smo zaustavili z ohladitvijo na 8 °C.

Po končanem pomnoževanju je sledilo odstranjevanje nevgrajenih dideoksinukleotidov s pomočjo kita DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Mikrokolono smo rahlo pretresli, odvili pokrovček za četrtno navoja in odlomili spodnji del mikrokolone. Mikrokolono s filtrom smo vložili v 2 ml zbiralno epruvetko ter jo centrifugirali 3 minute pri 3000 rpm. Zbiralno epruvetko smo zavrgli in mikrokolono vstavili v 1,5 ml epruvetko. Na sredino poševnega gela smo nanесли celotno sekvenčno mešanico. Sledilo je triminutno centrifugiranje pri 3000 rpm. DNA se je eluirala v epruvetko, ki smo jo prenesli v vakuumsko centrifugo za 11 minut. Posušeni DNA smo dodali 0,25 ml formamida, sledilo je 15 sekundno vorteksiranje. Reakcijsko mešanico smo prenesli v 0,2 ml PCR reakcijske epruvetke. Temu je sledila dvominutna denaturacija pri 95 °C in 15 minutno ohlajanje v ledenem bloku pri –20 °C.

Sekvenčna analiza je bila izvedena na instrumentu za avtomatsko sekveniranje ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied BioSystem, Kalifornija, ZDA).

Dobljena nukleotidna zaporedja smo analizirali z računalniškim programom BioEdit Sequence Alignment (North Carolina State University, ZDA). Iz komplementarnih delnih nukleotidnih zaporedij smo sestavili smiselno nukleotidno zaporedje. Z algoritmom BLAST smo poiskali podobna zaporedja v genski banki NCBI.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI FENOTIPSKE IDENTIFIKACIJE

Natančna in zanesljiva identifikacija bakterij kompleksa *B. cepacia* s fenotipskimi metodami predstavlja izziv. Študije navajajo primere napačne identifikacije in sicer je delež napačno opredeljenih bakterijskih izolatov kot *B. cepacia* med 10 in 20 % (LiPuma, 1999). Referenčne izolate, izolate zunanje kontrole in predhodno fenotipsko opredeljene klinične izolate smo poskušali identificirati z metodami, ki se uporabljajo v rutinskih laboratorijih. Bakterijske izolate smo opredelili s kombinacijo selektivnega gojišča BCA, dveh komercialnih identifikacijskih sistemov BD BBL Crystal E/NF in ID 32 GN ter biokemičnih testov.

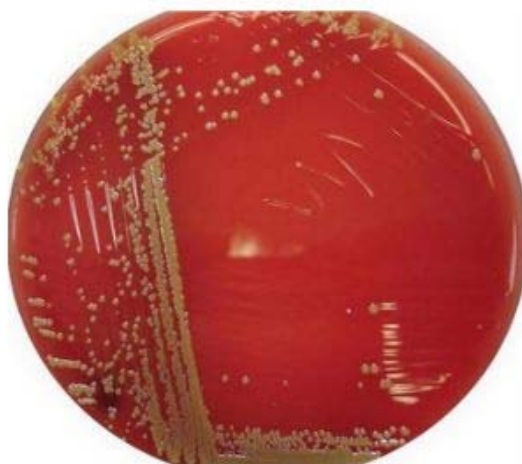
4.1.1 Osamitev bakterij kompleksa *B. cepacia*

Bakterijske izolate smo nacepili na krvni agar, MacConkey agar in BCA gojišče. Bakterijska rast je bila na krvnem agarju prisotna po 24 urah, izjemoma po 48 urah. Kolonije na krvnem agarju so bile sive barve, okrogle z gladkim robom (Slika 4) in imele so značilen vonj po zemlji. Kolonije referenčnega seva *B. cepacia* (genomovar I) in kliničnega izolata KI6 so bile rumeno pigmentirane (Slika 5). Nekateri bakterijski izolati referenčnih sevov *B. cenocepacia* (LMG 16656 in LMG 18830) so tvorili rjav pigment (Slika 6). Referenčna seva *B. pyrrocinia* in *B. vietnamiensis* sta bila β -hemolitična (Slika 7). Območja zbistritve okoli kolonij so bila prisotna tudi pri izolatu ZK5, pri kliničnih izolatih KI2, KI3, KI9 in KI10 ter pri dveh izolatih negativne kontrole *C. meningosepticum* in *C. indologenes* (Preglednica 17). Kolonije referenčnega izolata *B. gladioli* (LMG 18157) so bile majhne, sive in okrogle oblike. Oblika kolonij je prikazana na sliki 8. Rast 4 kliničnih izolatov enega bolnika (KI11-KI14) na krvnem agarju je bila za bakterije rodu *Burkholderia* neznačilna, kolonije bo bile bele barve, β -hemolitične in prijetnega sladkega vonja.

Rast bakterij kompleksa *B. cepacia* je bila počasnejša na MacConkey agarju, posledično smo inkubacijo podaljšali do tedna dni. Kolonije so bile temno vijolične ali rdečo-vijolične barve, okrogle in rahlo dvignjene (Slika 9).



Slika 4: *Burkholderia multivorans*, referenčni sev LMG 13010 (krvni agar, 48h)



Slika 5: *Burkholderia cepacia*, referenčni sev LMG 1222 (krvni agar, 48h)



Slika 6: *Burkholderia cenocepacia* H11B, referenčni sev LMG 18830 (krvni agar, 48h)



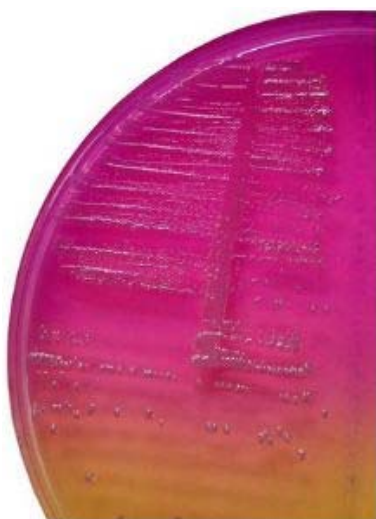
Slika 7: *Burkholderia vietnamiensis*, referenčni sev LMG 18835 (krvni agar, 48h)



Slika 8: *Burkholderia gladioli*, klinični izolat 1 (K11) (krvni agar, 48h)



Slika 9: *Burkholderia multivorans*, referenčni sev LMG 13010 (MacConkey agar, 48h)



Slika 10: *Burkholderia vietnamiensis*, referenčni sev LMG 18835 (*Burkholderia cepacia* agar, 48h)



Slika 11: *Burkholderia gladioli*, klinični izolat 7 (K17) (*Burkholderia cepacia* agar, 48h)

Na gojišču BCA smo sledili značilni rasti bakterij kompleksa *B. cepacia* in sicer so v 24 do 72 urah tvorile sive, okrogle kolonije, ter spremenile barvo gojišča iz prozorno-rumene v rožnato (Slika 10). Na selektivnem gojišču BCA referenčni izolat *B. gladioli* LMG 18157 ni porasel, medtem ko so vsi klinični izolati molekularno identificirani kot *B. gladioli* na BCA gojišču porasli. *B. gladioli* je na gojišču BCA tvorila sive okrogle kolonije z ravnim robom (Slika 11). Po 48 urni inkubaciji pri 37 °C se je barva BCA gojišča pri dveh

kliničnih izolatih *B. gladioli* (KI1 in KI3) spremenila v rožnato. Pri preostalih kliničnih izolatih *B. gladioli* se barva gojišča ni spremenila v rožnato, saj bakterije niso metabolizirale piruvata.

Gojišče BCA vsebuje žolčne kisline in kristal vijolično, ki preprečujeta rast po Gramu pozitivnih bakterij, dodatek antibiotikov pa zavira rast številnih po Gramu negativnih bakterij. Vendar gojišče ni popolnoma specifično za bakterije kompleksa *B. cepacia*, saj so na gojišču porasle tudi nekatere druge po Gramu negativne bakterije, ki so lahko tudi prisotne v sputumu bolnikov s cistično fibrozo: *B. gladioli*, *C. meningosepticum*, *P. pnomenusa*, *S. maltophilia* in *I. limosus*. Te bakterijske vrste imajo podobne fenotipske lastnosti kot *B. cepacia*, kar otežuje nadaljnjo fenotipsko identifikacijo. Selektivne komponente v gojišču BCA so inhibirale rast bakterij *A. baumannii*, *A. iwoffii*, *A. johnsonii*, *P. aeruginosa*, *C. indologenes* in *C. testosteroni* (Preglednica 17 in 18).

4.1.2 Fenotipski identifikacijski sistemi in biokemični testi

Referenčne seve, seve zunanje kontrole in klinične seve smo poskušali identificirati s fenotipskima komercialnima sistemoma BBL Crystal E/NF in ID 32 GN. Z identifikacijskima sistemoma smo uvrstili bakterijske izolate v kompleks *B. cepacia*, nista pa omogočala ločevanja med vrstami kompleksa *B. cepacia*.

Uspešnost identifikacije 14 izolatov referenčnih sevov in 5 izolatov zunanje kontrole kompleksa *B. cepacia* je bila s komercialnim sistemom BBL Crystal E/NF 84 % (16/19), napačno smo opredelili referenčna seva *B. cenocepacia* IIIA (LMG 12614) in *B. stabilis* (LMG 14294) ter izolat zunanje kontrole *B. vietnamiensis* (ZK5) kot bakterije rodu *Pseudomonas*. S sistemom smo pravilno identificirali referenčni sev LMG 18157 kot *B. gladioli*. S fenotipskim identifikacijskim sistemom ID 32 GN smo identificirali 89 % (17/19) izolatov kot bakterije kompleksa *B. cepacia*, vendar nismo uspeli opredeliti referenčnega seva *B. cenocepacia* IIIB (LMG 18830), *B. dolosa* (LMG18943) ter *B. gladioli* (LMG 18157) (Preglednica 14).

Preglednica 14: Rezultati identifikacije referenčnih sevov in sevov zunanjih kontrol z identifikacijskima sistemoma BBL Crystal E/NF in ID 32 GN

Bakterijski izolati		Identifikacijski sistem	
		Crystal E/EF	ID GN 32
Referenčni izolati	<i>Burkholderia cepacia</i> LMG 1222	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia multivorans</i> LMG 13010	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia multivorans</i> LMG 16660	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia multivorans</i> LMG 16775	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA LMG 12614	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA LMG 16656	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIB LMG 16654	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIB LMG 18829	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIB LMG 18830	<i>Burkholderia cepacia</i>	-
	<i>Burkholderia stabilis</i> LMG 14294	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG 18835	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia dolosa</i> LMG 18943	<i>Burkholderia cepacia</i>	-
	<i>Burkholderia pyrrocinia</i> LMG 21824	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia gladioli</i> LMG 18157	<i>Burkholderia gladioli</i>	-
Izolati zunanje kontrole	<i>Burkholderia multivorans</i> ZK1	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA ZK2	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia cepacia</i> ZK3	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia multivorans</i> ZK4	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> ZK5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIB ZK6	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Pandoraea pnomenusa</i> ZK7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Oligella</i> spp.
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> ZK8	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
	<i>Inquilinus limosus</i> ZK9	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	<i>Raoultella</i> spp.

Legenda: -: neuspešna identifikacija

Z identifikacijskima sistemoma BBL Crystal E/NF in ID 32 GN smo opredelili 9 kliničnih izolatov kot bakterije kompleksa *B. cepacia*, nismo pa uspeli identificirati nobenega izolata kot *B. gladioli*. V naslednjem koraku smo z algoritmom molekularnih testov identificirali sedem kliničnih izolatov kot *B. gladioli* (KI1, KI2, KI3, KI7, KI8, KI9 in KI10). Dva izolata (KI1 in KI10) smo s komercialnima sistemoma opredelili kot bakterije kompleksa *B. cepacia*, preostalih petih izolatov pa nismo uspeli identificirati (Preglednica 15). Nekateri klinični izolati *B. gladioli* smo s sistemoma BBL Crystal E/NF in ID 32 GN opredelili kot *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans* ali *Serratia* spp., vendar je bila v teh primerih zanesljivost identifikacije nizka. Iz tega razloga smo ob imenu teh sevov v preglednici 15 zabeležili neuspešno identifikacijo.

V literaturi navajajo podatke o premajhni občutljivosti in specifičnosti rezultatov identifikacije bakterij kompleksa *B. cepacia*. Bakterije *B. gladioli*, *S. maltophilia*, *Ralstonia* spp. lahko s komercialnimi identifikacijskimi sistemi napačno identificiramo kot *B. cepacia* (Coenye in sod. 2001a; McMenamin in sod., 2000; Shelly in sod., 2000). Zato smo zanesljivost rezultatov dobljenih s sistemoma BBL Crystal E/NF in ID 32 GN preverili z identifikacijo nekaterih po Gramu negativnih bacilov: *C. indologenes* (KI15), *C. meningosepticum* (KI16), *A. iwoffii* (KI17), *A. baumannii* (KI18), *A. johnsonii* (KI19), *C. testosteroni* (KI20), *S. maltophilia* (KI21), *P. aeruginosa* (KI22) ter *P. pnomenusa* (ZK7), *A. xylosoxidans* (ZK8) in *I. limosus* (ZK9) (Preglednica 4). Komercialna sistema nista uspešno identificirala vseh omenjenih bakterijskih izolatov, vendar pa jih s sistemoma nismo napačno identificirali kot bakterije kompleksa *B. cepacia* (Preglednica 15).

Preglednica 15: Rezultati identifikacije kliničnih izolatov z identifikacijskima sistemoma BBL Crystal E/NF in ID 32 GN

Bakterijski izolat		Identifikacijski sistem	
		Crystal E/EF	ID GN 32
Klinični izolati (KI)	KI1*	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	KI2*	-	<i>Burkholderia cepacia</i>
	KI3*	-	-
	KI4	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	KI5	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	KI6	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	KI7*	-	-
	KI8*	-	-
	KI9*	-	-
	KI10*	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	KI11	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	KI12	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	KI13	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
	KI14	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
"negativne kontrole"	KI15	-	<i>Vibrio alginolyticus</i>
	KI16	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>
	KI17	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	-
	KI18	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	KI19	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	-
	KI20	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>
	KI21	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	KI22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Legenda: -: neuspešna identifikacija

* z molekularnim algoritmom dokazana *Burkholderia gladioli*

Identifikacija bakterij kompleksa *B. cepacia* in *B. gladioli* s sistemoma BBL Crystal E/NF in ID 32 GN ni bila zanesljiva in ni omogočala ločevanja med vrstami kompleksa *B. cepacia*. Z dodatnimi biokemičnimi testi smo poskušali potrditi rezultat dobljen s komercialnima identifikacijskima sistemoma in identificirati nekatere vrste kompleksa *B. cepacia*.

Pri referenčnih bakterijskih izolatih *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB in *B. stabilis* ter pri izolatih zunanje kontrole *B. cenocepacia* IIIA in *B. cenocepacia* IIIB smo dokazali sposobnost razgradnje aminokisline ornitin. Referenčne izolate *B. cenocepacia* smo ločili od referenčnega seva *B. stabilis* po prisotni β -galaktozidazi ter rasti pri 42 °C (Preglednica 16). Encim ornitin dekarboksilazo smo dokazali tudi pri kliničnih izolatih KI5 ter KI11-14. Klinični izolat KI5 smo na podlagi prisotne lizin in ornitin dekarboksilaze ter odsotne β -galaktozidaze in rasti pri 42 °C pripisali vrsti *B. stabilis* (Preglednica 17). Klinične izolate KI11-KI14 nismo uspeli opredeliti do vrste, zaradi neznačilne rasti na krvnem agarju.

Pri bakterijskih izolatih *B. multivorans* (LMG 13010, LMG 16660, LMG 16775, ZK1 in ZK4) in referenčnemu izolatu *B. dolosa* (LMG 18143) nismo dokazali encima lizin dekarboksilaze, preostali izolati kompleksa *B. cepacia* pa so imeli sposobnost razgradnje aminokisline lizin. Bakterijski izolati *B. multivorans* in *B. dolosa* so se od preostalih izolatov kompleksa *B. cepacia* razlikovali po sposobnosti redukcije nitrata do nitrita (Preglednica 16).

Pri referenčnem izolatu LMG 18157 ter kliničnih izolatih *B. gladioli* nismo dokazali encima citokrom c oksidaze, lizin in ornitin dekarboksilaze. Nekateri sevi *B. gladioli* so reducirali nitrat do nitrita. Klinične izolate KI1, KI2, KI3, KI7, KI8, KI9 in KI10 smo ločili od bakterij kompleksa *B. cepacia* po negativnem oksidaznem testu. V pomoč pri razlikovanju bakterije *B. gladioli* od bakterij kompleksa *B. cepacia* nam je bila tudi rast na gojišču BCA (Preglednica 17).

Preglednica 16: Rezultati biokemičnega testiranja referenčnih izolatov in izolatov zunanje kontrole

Bakterijski izolat		Biokemični test										
		BCA	McC	O	42 °C	ONPG	LDC	ODC	NO ₃	želatina	pigment	hemoliza
Referenčni izolati	<i>B. cepacia</i> LMG 1222	+	+	+	+	+	+	-	-	-	rumen	-
	<i>B. multivorans</i> LMG 13010	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	<i>B. multivorans</i> LMG 16660	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
	<i>B. multivorans</i> LMG 16775	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA LMG 12614	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA LMG 16656	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>B. cenocepacia</i> IIIB LMG 16654	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>B. cenocepacia</i> IIIB LMG 18829	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>B. cenocepacia</i> IIIB LMG 18830	+	+	+	+	+	+	+	-	-	rjav	-
	<i>B. stabilis</i> LMG 14294	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
	<i>B. vietnamiensis</i> LMG 18835	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	β
	<i>B. dolosa</i> LMG 18943	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	<i>B. pyrrocinia</i> LMG 21824	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	β
	<i>B. gladioli</i> LMG 18157	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Izolati zunanje kontrole	<i>B. multivorans</i> ZK1	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA ZK2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	β
	<i>B. cepacia</i> ZK3	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
	<i>B. multivorans</i> ZK4	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
	<i>B. vietnamiensis</i> ZK5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	<i>B. cenocepacia</i> IIIB ZK6	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	β
	<i>Pandoraea pnomenusa</i> ZK7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> ZK8	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
	<i>Inquilinus limosus</i> ZK9	sluzne	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Legenda: +: pozitiven rezultat, -: negativen rezultat, BCA: *Burkholderia cepacia* agar, McC: MacConkey agar, O: oksidaza, 42 °C: rast pri 42 °C, ONPG: o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid, LDC: lizin dekarboksilaza, ODC: ornitin dekarboksilaza, NO₃: redukcija nitrata, pigment: tvorba pigmenta, hemoliza: hemoliza na krvnem agarju

Preglednica 17: Rezultati biokemičnega testiranja kliničnih izolatov

Bakterijski izolat		Biokemični test											ID
		BCA	McC	O	42 °C	ONPG	LDC	ODC	NO ₃	želatina	pigment	hemoliza	
Klinični izolati (KI)	KI1	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	/
	KI2	+, ni Δ	+	-	+	+	-	-	+	-	-	β	<i>B. gladioli</i>
	KI3	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	β	/
	KI4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	/
	KI5	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	<i>B. stabilis</i>
	KI6	+	+	+	+	+	+	-	-	+	rumen	-	<i>B. cepacia</i>
	KI7 - KI8	+, ni Δ	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>B. gladioli</i>
	KI9	+, ni Δ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	β	<i>B. gladioli</i>
	KI10	+, ni Δ	+	-	+	+	-	-	-	-	-	β	<i>B. gladioli</i>
	KI11 - KI14	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	β	/
"negativne kontrole"	KI15	-	slaba	-	+	-	+	+	+	-	-	β	/
	KI16	+	slaba	+	+	+	-	-	-	+	-	β	/
	KI17	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. cepacia</i>
	KI18	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. cepacia</i>
	KI19	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. cepacia</i>
	KI20	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. cepacia</i>
	KI21	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>B. cepacia</i>
	KI22	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. cepacia</i>

Legenda: +: pozitiven rezultat, -: negativen rezultat, BCA: *Burkholderia cepacia* agar, ni Δ: prisotna rast, vendar ni spremembe barve gojišča v rožnato, McC: MacConkey agar, O: oksidaza, 42 °C: rast pri 42 °C, ONPG: o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid, LDC: lizin dekarboksilaza, ODC: ornitin dekarboksilaza, NO₃: redukcija nitrata, pigment: tvorba pigmenta, hemoliza: hemoliza na krvnem agarju, ID: identifikacija na osnovi rezultatov biokemičnih testov, /: identifikacija ni možna, ~~*B. cepacia*~~: glede na rezultate biokemičnih testov bakterijski izolat ni del kompleksa *B. cepacia*

4.2 REZULTATI MOLEKULARNE IDENTIFIKACIJE

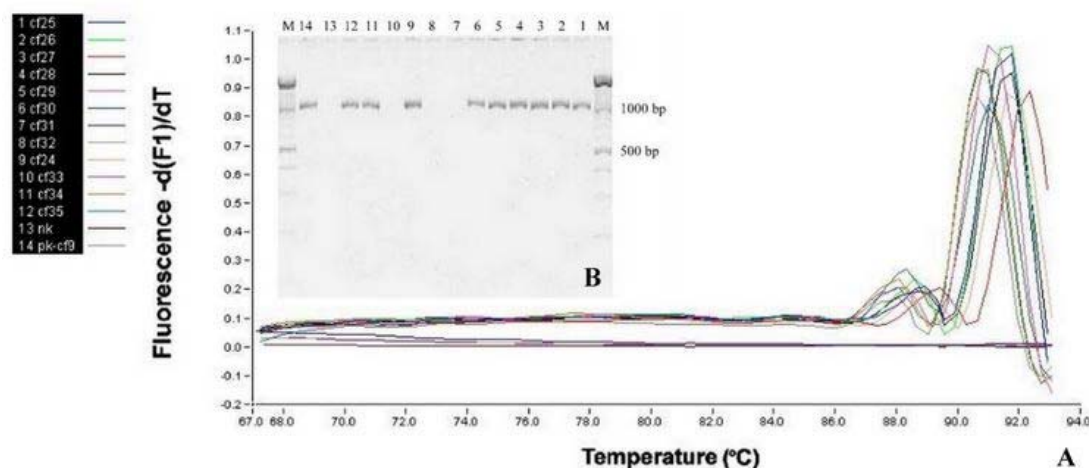
Medicinsko pomembne bakterije kompleksa *B. cepacia* in *B. gladioli* smo identificirali do vrste z večimi PCR protokoli. Prvi korak pri molekularni identifikaciji je bil PCR protokol specifičen za kompleks *B. cepacia*.

4.2.1 *B. cepacia* kompleks specifični PCR

Bakterijske izolate smo razdelili v dve skupini glede na uspešnost pomnoževanja gena *recA* z oligonukleotidnima začetnikoma BCR1 in BCR2. Bakterijske izolate s pozitivnim rezultatom pomnoževanja smo uvrstili v kompleks *B. cepacia*. V naslednjem koraku smo jim določili vrsto z nadaljnjimi protokoli PCR ali sekveniranjem, medtem ko smo izolate z negativnim rezultatom pomnožili z oligonukleotidnimi začetniki specifičnimi za rod *Burkholderia* in vrsto *B. gladioli*.

Pri *B. cepacia* kompleks specifičnem PCR smo pomnoževali bakterijsko DNA v napravi LightCycler 1.5. V kompleks *B. cepacia* smo uvrstili vse izolate, pri katerih je prišlo do pomnoževanja DNA in se je vrednost talilne temperature pridelka RT-PCR ujemala z vrednostjo T_m pozitivne kontrole (90-91 °C). Gen *recA* se je uspešno pomnožil pri vseh izolatih referenčnih sevov, z izjemo referenčnega seva *B. gladioli* LMG 18157 (Preglednica 18). Fragment velikosti 1043 bp se je uspešno pomnožil tudi pri šestih izolatih zunanje kontrole (ZK1-ZK6) in pri 7 od 22 kliničnih izolatih (KI4, KI5, KI6 ter KI11-KI14) (Preglednica 19) (Slika 12). Pri kliničnih izolatih KI1, KI2, KI3, KI7, KI8, KI9 in KI10 je bil rezultat *B. cepacia* kompleks specifičnega PCR negativen (Preglednica 20).

DNA izolati po Gramu negativnih vrst so služili kot negativna kontrola za preverjanje specifičnosti oligonukleotidnih začetnikov BCR1 in BCR2. Rezultat pomnoževanja gena *recA* je bil negativen pri 8 kliničnih izolatih (KI15-KI22) in 3 izolatih zunanje kontrole (ZK7, ZK8, ZK9).



Slika 12: Talilna krivulja *Burkholderia cepacia* kompleks specifičnega PCR (A) in dokaz 1043 bp dolgega odseka gena *recA* z elektroforezo v gelu (B). Linije: M: molekularni označevalec velikost 100 bp, 1: ZK2, 2: ZK3, 3: ZK4, 4: ZK5, 5: KI11, 6: ZK6, 7: KI1, 8: KI2, 9: ZK1, 10: KI3, 11: KI12, 12: KI13, 13: negativna kontrola (voda), 14: pozitivna kontrola (*B. cenocepacia* IIIB sev LMG 16654)

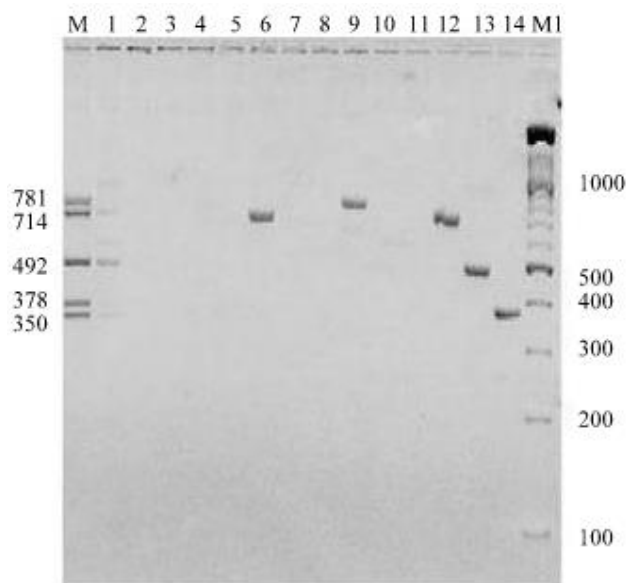
4.2.2 Določanje vrste/genomovarja izolatov kompleksa *B. cepacia*

Bakterijske izolate smo opredelili do vrste s protokolom večkratnega PCR, z vrstno specifičnimi protokoli PCR ter v primeru neuspeha z metodo določanja nukleotidnega zaporedja.

4.2.2.1 Večkratni PCR: identifikacija vrst *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB in *B. dolosa*

Večkratni PCR je omogočal identifikacijo vrst *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB in *B. dolosa*. Z metodo smo uspešno opredelili izolate referenčnih sevov *B. cepacia* (LMG 1222), *B. multivorans* (LMG 13010, LMG 16660, LMG 16775), *B. cenocepacia* IIIA (LMG 12614, LMG 16656), *B. cenocepacia* IIIB (LMG 16654, LMG 18829, LMG 18830) in *B. dolosa* (LMG 18943). Z večkratnim PCR smo pri petih izolatih zunanje kontrole uspešno pomnožili gen *recA* in jih glede na velikost pomnoženega odseka gena *recA* opredelili kot *B. cepacia* (ZK3), *B. multivorans* (ZK1 in ZK4), *B. cenocepacia* IIIA (ZK2) in *B. cenocepacia* IIIB (ZK6) (Preglednica 18) (Slika

13). Pri dveh kliničnih izolatih (KI4 in KI6) smo z večkratnim PCR pomnožili 492 bp velik odsek gena *recA* (Slika 13) in izolata identificirali kot *B. cepacia* (Preglednica 19).



Slika 13: Dokaz pridelkov PCR večkratnega PCR z elektroforezo v gelu. Linije: M: molekularni označevalec sestavljen iz pridelkov PCR referenčnih sevov *Burkholderia cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA in *B. cenocepacia* IIIB, 1: pozitivna kontrola, 2: negativna kontrola (voda), 3: KI13, 4: KI12, 5: KI3, 6: ZK1 (*B. multivorans*), 7: KI2, 8: KI1, 9: ZK6 (*B. cenocepacia* IIIB), 10: KI11, 11: ZK5, 12: ZK4 (*B. cenocepacia* IIIA), 13: ZK3 (*B. cepacia*), 14: ZK4 (*B. multivorans*), M1: molekularni označevalec velikosti 100 bp

4.2.2.2 Vrsto specifični PCR: identifikacija vrst *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia*

Referenčne izolate, ki jim nismo uspeli določiti vrste z večkratnim PCR, smo poskušali identificirati z vrsto specifičnimi protokoli PCR. V prvem koraku smo izvedli vrsto specifične PCR za *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa* in tako identificirali referenčne izolate LMG 14294, LMG 18835 in LMG 18943 in izolat zunanje kontrole ZK5. V naslednjem koraku smo opredelili z *B. pyrrocinia* specifičnim PCR še referenčni izolat LMG 21824 (Preglednica 18).

Preglednica 18: Rezultati identifikacije izolatov referenčnih sevov in izolatov zunanje kontrole z molekularnim algoritmom

Bakterijski izolat		PCR BCR1/2	Večkratni PCR	Vrstno specifični PCR	
		gen <i>recA</i>		gen <i>recA</i>	gen <i>fur</i>
Referenčni izolati	<i>B. cepacia</i> LMG 1222	+	<i>B. cepacia</i>	ND	<i>B. cepacia</i>
	<i>B. multivorans</i> LMG 13010	+	<i>B. multivorans</i>	ND	<i>B. multivorans</i>
	<i>B. multivorans</i> LMG 16660	+	<i>B. multivorans</i>	ND	ND
	<i>B. multivorans</i> LMG 16775	+	<i>B. multivorans</i>	ND	ND
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA LMG 12614	+	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	ND	ND
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA LMG 16656	+	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	ND	ND
	<i>B. cenocepacia</i> IIIB LMG 16654	+	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	ND	ND
	<i>B. cenocepacia</i> IIIB LMG 18829	+	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	ND	ND
	<i>B. cenocepacia</i> IIIB LMG 18830	+	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	ND	<i>B. cenocepacia</i>
	<i>B. stabilis</i> LMG 14294	+	-	<i>B. stabilis</i>	<i>B. stabilis</i>
	<i>B. vietnamiensis</i> LMG 18835	+	-	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>
	<i>B. dolosa</i> LMG 18943	+	<i>B. dolosa</i>	<i>B. dolosa</i>	ND
	<i>B. pyrrocinia</i> LMG 21824	+	-	ND	<i>B. pyrrocinia</i>
	<i>B. gladioli</i> LMG 18157	-	ND	ND	ND
Izolati zunanje kontrole	<i>B. multivorans</i> ZK1	+	<i>B. multivorans</i>	ND	<i>B. multivorans</i>
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA ZK2	+	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	ND	<i>B. cenocepacia</i>
	<i>B. cepacia</i> ZK3	+	<i>B. cepacia</i>	ND	<i>B. cepacia</i>
	<i>B. multivorans</i> IIIB ZK4	+	<i>B. multivorans</i>	ND	<i>B. multivorans</i>
	<i>B. vietnamiensis</i> ZK5	+	-	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>
	<i>B. cenocepacia</i> ZK6	+	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	ND	<i>B. cenocepacia</i>
	<i>P. pnomenusa</i> ZK7	-	ND	ND	ND
	<i>A. xylosoxidans</i> ZK8	-	ND	ND	ND
	<i>I. limosus</i> ZK9	-	ND	ND	ND

Legenda: +: pozitivno pomnoževanje, -: ni pomnoževanja, ND: ni delano

Pri sedmih kliničnih izolatih smo z oligonukleotidnima začetnikoma BCR1 in BCR2 uspešno pomnožili odsek gena *recA*. Dvema kliničnima izolatoma smo določili vrsto z večkratnim PCR, preostalih petim kliničnim izolatoma (KI5, KI11-KI14) pa smo poskušali določiti vrsto *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina* ali *B. pyrrocinia* z vrstno specifičnimi protokoli PCR. Specifičnost PCR produktov kliničnih izolatov smo določili na osnovi vrednosti T_m referenčnih sevov. Talilna temperatura je za bakterijo *B. stabilis* znašala 90 °C, za bakterijo *B. vietnamiensis* 91 °C, za bakterijo *B. dolosa* 88 °C in za bakterijo *B. pyrrocinia* 89 °C (Preglednica 9). Klinični izolat KI5 smo na osnovi talilne temperature opredelili kot *B. stabilis*, le-ta je bila enaka kot pri pozitivni kontroli (referenčni sev LMG 14294).

4.2.2.3 Določanje nukleotidnega zaporedja

Štiri klinične izolate (KI11-KI14), osamljene pri enem bolniku v različnem časovnem obdobju, nismo uspešno identificirali z večkratnim PCR in nadaljnjimi vrstno specifičnimi protokoli PCR. Pri teh izolatih smo uspešno pomnožili 1043 bp dolg odsek gena *recA* z oligonukleotidnima začetnikoma BCR1 in BCR2. Bakterijske izolate smo poskušali identificirati s sekveniranjem pomnoženega odseka gena *recA* z oligonukleotidi BCR1 in BCR3 ter BCR2 in BCR4. Dobljeno nukleotidno zaporedje se je razlikovalo v enem nukleotidnem mestu od nukleotidnega zaporedja gena *recA* v genski banki z dostopno številko AF456040. Nukleotidno zaporedje AF456040 so Mahenthiralingam in sodelavci opredelili z MLST analizo kot eno iz med novih vrst kompleksa *B. cepacia* (Bcc skupina 5) (Mahenthiralingam, 2009).

Preglednica 19: Rezultati identifikacije 7 kliničnih izolatov kompleksa *Burkholderia cepacia* z molekularnim algoritmom

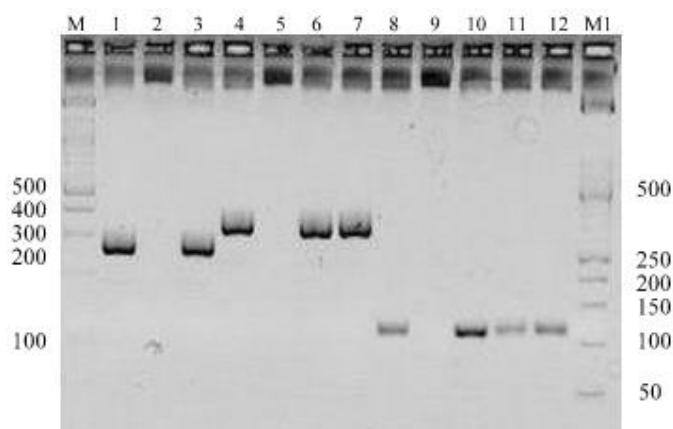
Bakterijski izolat	PCR BCR1/2	Večkratni PCR	Vrstno specifični PCR		Sekveniranje BCR1-BCR4
	gen <i>recA</i>		gen <i>recA</i>	gen <i>fur</i>	
KI4	+	<i>B. cepacia</i>	ND	<i>B. cepacia</i>	ND
KI5	+	-	<i>B. stabilis</i>	<i>B. stabilis</i>	ND
KI6	+	<i>B. cepacia</i>	ND	<i>B. cepacia</i>	ND
KI11-KI14*	+	-	-	ND	Bcc5

Legenda: +: pozitivno pomnoževanje, -: ni pomnoževanja, ND: ni delano

*izolati osamljeni pri enem bolniku v različnem časovnem obdobju

4.2.2.4 Protokol za dokazovanje gena *fur*

Pravilnost identifikacije bakterij kompleksa *B. cepacia* smo preverili z oligonukleotidnimi začetniki, ki pomnožujejo gen *fur* (Slika 14). Z vrstno specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki smo uspešno pomnožili značilen odsek gena *fur* referenčnih sevov *B. cepacia* (LMG 1222), *B. multivorans* (LMG 13010), *B. cenocepacia* (LMG 18830), *B. stabilis* (LMG 14294) in *B. vietnamiensis* (LMG 18835), sevov zunanje kontrole (ZK1-ZK6) (Preglednica 18) in kliničnih izolatov KI4, KI5 in KI6 (Preglednica 19). S PCR protokolom pomnoževanja gena *fur* smo tako potrdili rezultate pridobljene z molekularnim algoritmom, ki temelji na pomnoževanju gena *recA*.



Slika 14: Dokaz pomnoženih odsekov gena *fur* z vrstno specifičnimi PCR z elektroforezo v gelu. Linije: M: molekularni označevalec velikosti 100 bp, 1: pozitivna kontrola (*B. stabilis* LMG 14294, fragment 275 bp), 2: negativna kontrola (voda), 3: KI5 (*B. stabilis*), 4: pozitivna kontrola (*B. multivorans* LMG 13010, fragment 342 bp), 5: negativna kontrola (voda), 6: ZK1 (*B. multivorans*), 7: ZK4 (*B. multivorans*), 8: pozitivna kontrola (*B. cepacia* LMG 1222, fragment 117bp), 9: negativna kontrola (voda), 10: KI6 (*B. cepacia*), 11: KI4 (*B. cepacia*), 12: ZK3 (*B. cepacia*), M1: molekularni označevalec velikosti 50 bp

4.2.3 Identifikacija *B. gladioli*

4.2.3.1 PCR protokol specifičen za rod *Burkholderia*

S PCR protokolom specifičnim za rod *Burkholderia* smo testirali vse bakterijske izolate, ki niso del kompleksa *B. cepacia* (rezultat *B. cepacia* kompleks specifičnega PCR je bil negativen). Z oligonukleotidnima začetnikoma BUR1 in BUR2 se je pri referenčnem izolatu LMG 18157 in kliničnih izolatih KI1, KI2, KI3, KI7, KI8, KI9 in KI10 uspešno pomnožil 869 bp velik fragment gena *recA* bakterij rodu *Burkholderia* (Preglednica 20).

4.2.3.2 PCR protokol specifičen za *B. gladioli*

Izmed vrst rodu *Burkholderia* je *B. gladioli*, poleg bakterij kompleksa *B. cepacia*, najverjetnejši povzročitelj okužb spodnjih dihal pri bolnikih s cistično fibrozo. Zato smo v naslednjem koraku bakterijske izolate rodu *Burkholderia*, ki niso del kompleksa *B. cepacia*, testirali s PCR protokolom specifičnim za *B. gladioli*.

Z oligonukleotidnima začetnikoma specifičnima za *B. gladioli* (LP1 in LP4) smo poskušali opredeliti referenčni izolat LMG 18157 in sedem kliničnih izolatov, ki smo jih uspešno pomnožili s protokolom PCR specifičnim za rod *Burkholderia*. Pri vseh sedmih kliničnih izolatih in referenčnemu izolatu smo uspešno pomnožili odsek gena 23S rRNA (Preglednica 20).

Preglednica 20: Rezultati identifikacije kliničnih izolatov, ki pripadajo rodu *Burkholderia*, vendar niso del kompleksa *B. cepacia*

Izolat	PCR BCRI/2	PCR BUR1/2	PCR LP1/4
KI1	-	+	<i>B. gladioli</i>
KI2	-	+	<i>B. gladioli</i>
KI3	-	+	<i>B. gladioli</i>
KI7*	-	+	<i>B. gladioli</i>
KI8*	-	+	<i>B. gladioli</i>
KI9	-	+	<i>B. gladioli</i>
KI10	-	+	<i>B. gladioli</i>
<i>B. gladioli</i> LMG 18157	-	+	<i>B. gladioli</i>

Legenda: +: pozitivno pomnoževanje, -: ni pomnoževanja

* izolata osamljena pri enem bolniku v različnem časovnem obdobju

4.2.4 Molekularni algoritem

Z različnimi protokoli PCR smo uspešno identificirali v raziskavo vključene klinične izolate rodu *Burkholderia* (Preglednica 21). Na osnovi vseh dobljenih rezultatov molekularnih identifikacijskih protokolov smo oblikovali algoritem za molekularno identifikacijo izolatov kompleksa *B. cepacia* in drugih za bolnike s cistično fibrozo pomembnih bakterij iz rodu *Burkholderia*, ki bo izvedljiv v rutinskem bakteriološkem laboratoriju, ki v diagnostično obdelavo dobi kužnine velike večine slovenskih bolnikov s cistično fibrozo.

Sprva smo izvedli protokol PCR specifičen za kompleks *B. cepacia*. Bakterijske izolate s pozitivnim rezultatom smo nato poskušali identificirati do vrste s protokolom večkratnega PCR, ki omogoča detekcijo bakterij *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB in *B. dolosa*. V primeru negativnega rezultata smo nato izvedli vrstno specifičen PCR za *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* in *B. dolosa*. Če je bil rezultat pomnoževanja zopet negativen smo izvedli še nadaljnje vrstno specifične PCR za bakterije

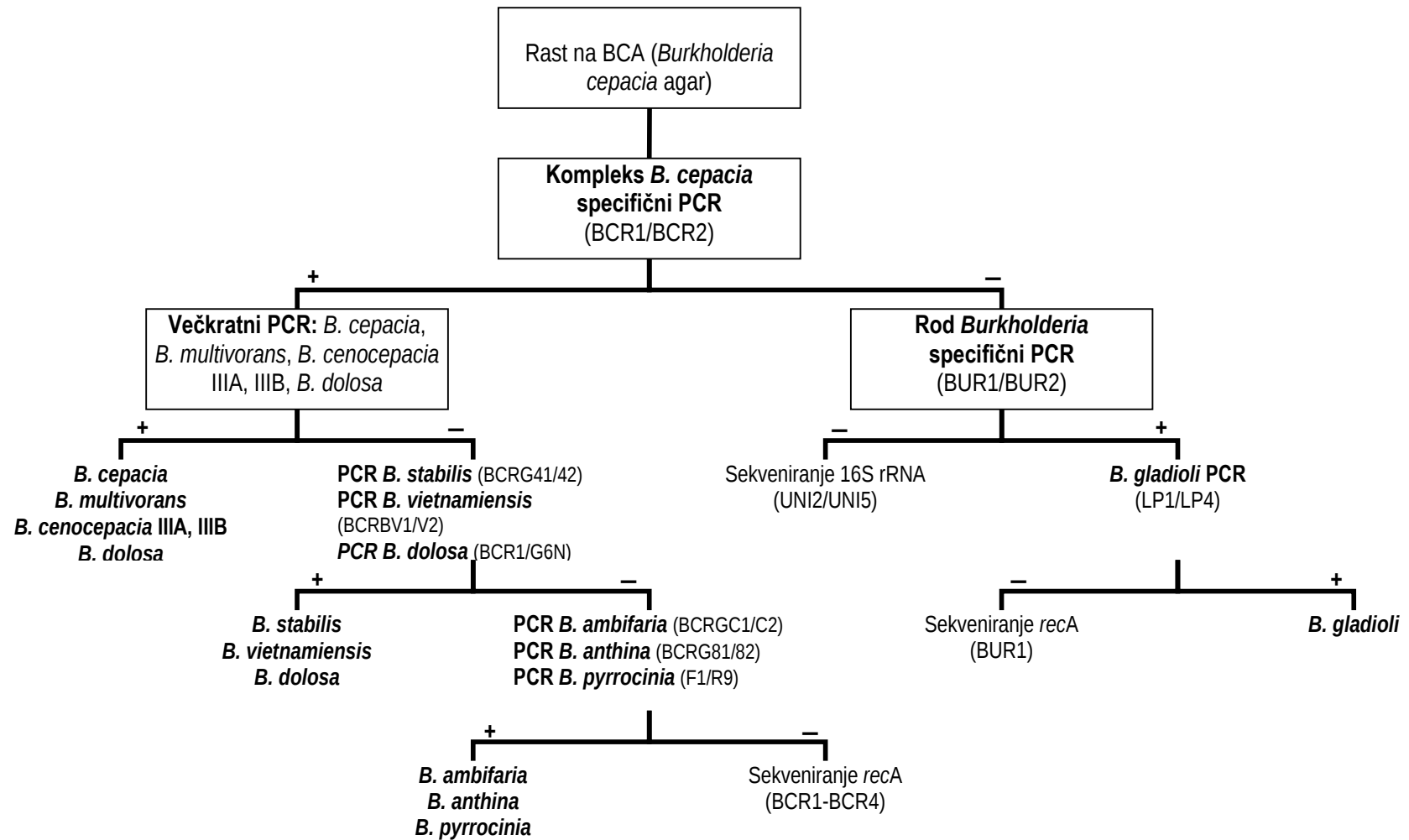
B. ambifaria, *B. anthina* in *B. pyrrocinia*. Za novejšje vrste kompleksa *B. cepacia* ni oblikovanih oligonukleotidnih začetnikov, zato smo v primeru neuspeha pri določanju vrste kompleksa *B. cepacia* sekvenirali gen *recA* in na podlagi dobljenega nukleotidnega zaporedja določili vrsto.

Bakterijske izolate, pri katerih je bil rezultat kompleks *B. cepacia* specifičnega PCR negativen, smo testirali s protokolom PCR specifičnim za rod *Burkholderia*. V primeru pozitivnega rezultata smo izvedli še protokol PCR specifičen za *B. gladioli*. Algoritem testiranja je prikazan na sliki 15.

Preglednica 21: Rezultati fenotipske in molekularne identifikacije kliničnih izolatov rodu *Burkholderia*

Isolat	Fenotipska identifikacija		Molekularna identifikacija
	Crystal E/EF	ID GN 32	
KI1	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. gladioli</i>
KI2	-	<i>B. cepacia</i>	<i>B. gladioli</i>
KI3	-	-	<i>B. gladioli</i>
KI4	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
KI5	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. stabilis</i>
KI6	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
KI7	-	-	<i>B. gladioli</i>
KI8	-	-	<i>B. gladioli</i>
KI9	-	-	<i>B. gladioli</i>
KI10	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. gladioli</i>
KI11 – KI14	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	Bcc5

Legenda: -: neuspešna identifikacija



Slika 15: Algoritem molekularnih testov za identifikacijo vrst kompleksa *Burkholderia cepacia* in *Burkholderia gladioli*

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Bakterije kompleksa *B. cepacia* povzročajo okužbe pri bolnikih s cistično fibrozo in drugih imunsko oslabljenih osebah. Bakterijske vrste kompleksa *B. cepacia* se razlikujejo po patogenosti, sposobnosti prenosa med bolniki in pogostosti povzročanja okužb. Pravilna identifikacija bakterijskega povzročitelja je tako ključnega pomena za začetek antibiotičnega zdravljenja in nadaljnje ukrepe za preprečevanje širjenja bakterij med bolniki (Miller in Gilligan, 2003).

5.1.1 Fenotipska identifikacija

Pred razvojem molekularnih pristopov je identifikacija bakterij kompleksa *B. cepacia* s fenotipskimi testi predstavljala velik izziv. Stopnja napačne identifikacije je bila zelo visoka (10-36 %) (Zuckerman in Seder, 2007). V rutinskih laboratorijih klasična bakteriološka diagnostika bakterij kompleksa vključuje osamitev bakterij na selektivnem gojišču in identifikacijo do nivoja kompleksa *B. cepacia* s komercialnimi fenotipskimi sistemi ter dodatnimi biokemičnimi testi (LiPuma in sod., 2007). S tem pristopom lahko napačno identificiramo tudi izolate nekaterih drugih rodov po Gramu negativnih bacilov kot bakterije kompleksa *B. cepacia*.

Izolacija in identifikacija bakterij kompleksa *B. cepacia* je iz sputuma bolnikov s cistično fibrozo s fenotipskimi metodami težavna. V kužnini so lahko prisotne številne bakterije z različnimi ravnimi zahtevami, ki jih v primeru nepravilno izbranega gojišča ne bomo uspeli osamiti in identificirati. Bakterije kompleksa *B. cepacia* so počasi rastoče in porastejo na neselektivnih gojiščih (krvni agar) in nekaterih selektivnih gojiščih (MacConkey agar). Krvni agar podpira rast številnih bakterij in ni primeren za osamitev bakterij kompleksa *B. cepacia*, saj jih lahko prerastejo hitreje rastoče bakterije (Gibson in sod., 2003). Uspešno izolacijo bakterij kompleksa *B. cepacia* dosežemo s kultivacijo kužnine na selektivnem gojišču BCA, ki podpira rast vseh vrst kompleksa *B. cepacia*. Na gojišču BCA lahko porastejo tudi nekatere druge po Gramu negativne bakterije, ki so lahko

prisotne v sputumu bolnikov s cistično fibrozo: *B. gladioli*, *C. meningosepticum*, *P. pnomenusa*, *S. maltophilia* in *I. limosus* (Preglednica 16 in 17).

V raziskavo je bilo vključenih 22 kliničnih vzorcev, od tega je bilo 14 izolatov predhodno fenotipsko opredeljenih kot *B. cepacia*, *B. gladioli* ali nefermentativni po Gramu negativni bacili ter 8 izolatov po Gramu negativnih bakterij, ki so nam služile kot "negativne kontrole" (Preglednica 4). Od 14 fenotipsko opredeljenih izolatov kot *B. cepacia* ali *B. gladioli* smo z molekularnimi metodami identificirali 7 izolatov kot *B. gladioli* in 7 izolatov kot vrste kompleksa *B. cepacia* (Preglednica 21). Z uporabo vsaj enega fenotipskega komercialnega sistema BBL Crystal E/NF ali ID 32 GN smo identificirali kot *B. cepacia* vse klinične (KI4-KI6, KI11-KI14) in vse referenčne izolate bakterij kompleksa *B. cepacia* (Preglednica 14 in 15). Enako velja za referenčni izolat *B. gladioli*, medtem ko kliničnih izolatov *B. gladioli* nismo uspeli opredeliti. Slabost identifikacije s komercialnima identifikacijskima sistemoma so poleg lažno negativnih rezultatov tudi lažno pozitivni rezultati. Oba identifikacijska sistema lahko bakterijo *B. gladioli* napačno identificirata kot *B. cepacia*. Bakterijskih vrst, ki smo jih v naši raziskavi uporabili kot negativne kontrole (KI15-KI22) (Preglednica 4), sicer nismo napačno opredelili kot *B. cepacia*, vendar v literaturi navajajo podatke o napačni identifikaciji po Gramu negativnih bakterij iz rodov: *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* in *Pandoraea* (McMenamin in sod., 2000). Komercialni identifikacijski sistemi tudi ne omogočajo ločevanja vrst kompleksa *B. cepacia*, ki pa je ključnega pomena pri obravnavi bolnika s cistično fibrozo.

Dodatni biokemični testi bi lahko predstavljali koristno orodje za potrditev s komercialnim sistemom dobljenega rezultata in morda omogočali opredelitev nekaterih vrst kompleksa *B. cepacia* ter ločevanje bakterij *B. cepacia* od drugih po Gramu negativnih bacilov. Po podatkih iz literature identifikacija vrst kompleksa *B. cepacia* s posameznimi biokemičnimi testi ni zanesljiva, vendar ima pomen pri potrditvi suma okužbe z vrstami *B. multivorans* in *B. stabilis* (Henry in sod., 2001). Vrste *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis* in *B. dolosa* lahko ločimo s testi ONPG, prisotnostjo lizin in ornitin dekarboksilaze, sposobnostjo redukcije nitrata do nitrita ter rastjo pri 42 °C. Vrsti *B. multivorans* in *B. dolosa* ločimo od preostalih vrst kompleksa *B. cepacia* po odsotni lizin

dekarboksilazi in sposobnosti redukcije nitrata do nitrita. Okužbo z vrstama *B. dolosa* in *B. cenocepacia* lahko potrdimo s sposobnostjo dekarboksilacije ornitina, vrsti pa ločimo z rastjo pri 42 °C ter testom ONPG. Z oksidaznim testom ločimo tudi *B. gladioli* od vrst kompleksa *B. cepacia* (Preglednica 16). Pri identifikaciji bakterij kompleksa *B. cepacia* do vrste *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis*, *B. ambifaria* in *B. pyrrocinia* ima pomembno vlogo tudi morfologija bakterijskih kolonij na krvnem agarju in izgled gojišča. Bakterijske kolonije izolatov *B. cepacia* so v 78 % rumeno pigmentirane (Slika 5) (LiPuma in sod., 2007), medtem ko nekateri izolati *B. cenocepacia* izločajo rjav pigment v gojišče (Slika 6). β -hemolitična aktivnost nakazuje na okužbo z vrstami *B. vietnamiensis*, *B. ambifaria* ali *B. pyrrocinia* (Slika 7). S testiranjem referenčnih izolatov, izolatov zunanje kontrole ter kliničnih izolatov *B. gladioli* ter vrst *B. cepacia* iz kompleksa *B. cepacia* smo podatke iz literature potrdili. Žal smo imeli premalo kliničnih izolatov različnih vrst kompleksa *B. cepacia*, da bi lahko preverili uporabnost teh testov v našem okolju. Kljub temu so nam bili rezultati biokemičnih testov v pomoč pri oblikovanju suma o bakterijskem povzročitelju ter pri ločevanju bakterij kompleksa *B. cepacia* od bakterije *B. gladioli*.

5.1.2 Molekularna identifikacija

Ključno vlogo pri dokazovanju okužb z bakterijami kompleksa *B. cepacia* in *B. gladioli* ima molekularni pristop, ki omogoča hitrejšo in predvsem zanesljivejšo opredelitev bakterij. V zadnjih letih se taksonomija kompleksa *B. cepacia* z razvojem novih molekularnih metod, predvsem MLST analize, hitro spreminja. Uporaba MLST analize je v rutinskih laboratorijih omejena, identifikacijo najpogostejših povzročiteljev okužb iz kompleksa *B. cepacia* pri človeku pa lahko dosežemo s PCR protokoli, ki temeljijo na pomnoževanju značilnega odseka gena *recA* bakterij kompleksa *B. cepacia*.

Do današnjega dne še ni oblikovanega standardnega molekularnega pristopa za diagnostiko bakterijskih vrst kompleksa *B. cepacia* in drugih medicinsko pomembnih bakterij rodu *Burkholderia*. V diplomski nalogi smo želeli oblikovati, preizkusiti in ovrednotiti molekularni algoritem za identifikacijo bakterij kompleksa *B. cepacia* in *B. gladioli*, ki bi

bil izvedljiv v rutinskem bakteriološkem laboratoriju, ki v Sloveniji v diagnostično obdelavo dobi kužnine velike večine bolnikov s cistično fibrozo.

Molekularni algoritem smo zasnovali na številnih predhodno objavljenih študijah, ki so identifikacijo dosegle z različnimi metodami, od *B. cepacia* kompleks specifičnega PCR, vrstno specifičnih PCR in sekveniranja odseka značilnega gena (Mahenthiralingam in sod., 2000; Lynch in Dennis, 2008).

Vse referenčne in klinične izolate ter izolate zunanje kontrole vključene v raziskavo smo uspešno opredelili s protokolom, ki so ga razvili Mahenthiralingam in sod (2000). PCR protokol je specifičen za kompleks *B. cepacia*, z oligonukleotidnima začetnikoma BCR1 in BCR2 smo pomnožili odsek gena *recA* značilne velikosti. Oligonukleotidna začetnika nista navzkrižno reaktivna z *B. gladioli* (Preglednica 20) ali drugimi po Gramu negativnimi bakterijami, ki jih lahko osamimo iz dihal in lahko tudi rastejo na selektivnem gojišču BCA: *Acinetobacter* spp., *Chryseobacterium* spp., *S. maltophilia*, *C. testosteroni*, *A. xylosoxidans*, *P. pnomenusa* in *I. limosus*. Pri pozitivnem rezultatu pomnoževanja smo zaključili, da gre za bakterijo kompleksa *B. cepacia*, ki smo jo v naslednjem koraku opredelili do vrste s protokolom večkratnega PCR ali z dodatnimi protokoli PCR, specifičnimi za bakterijske vrste *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina* in *B. pyrrocinia*.

Oblikovan algoritem molekularnih testov temelji na identifikaciji bakterije do nivoja vrste s pomnoževanjem značilnega odseka gena *recA* (*B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria* in *B. anthina*) in gena *fur* vrste *B. pyrrocinia*. Večkratni PCR omogoča identifikacijo najpogostejših in hkrati najbolj patogenih vrst kompleksa *B. cepacia*, ki povzročajo okužbe pri bolnikih s cistično fibrozo: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB in *B. dolosa*. Bakterijsko vrsto smo opredelili glede na velikost pomnoženega fragmenta. Pri protokolu večkratnega PCR smo uporabili mešanico oligonukleotidnih začetnikov specifičnih za vrste *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA in *B. cenocepacia* IIIB. Z večkratnim PCR, ki sicer ne vsebuje oligonukleotidnih začetnikov specifičnih za vrsto *B. dolosa*, smo dokazali tudi referenčni

izolat *B. dolosa*, pri katerem se je pomnožil približno 350 bp velik odsek gena *recA* (Preglednica 18). V primeru, če bakterijskega izolata nismo uspeli opredeliti do vrste z večkratnim PCR, smo izvedli ločene vrstno specifične PCR za vrste kompleksa *B. cepacia* (*B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina* in *B. pyrrocinia*). Uporabljeni oligonukleotidni začetniki so bili specifični, saj so pomnožili le odsek gena *recA* tarčne bakterijske vrste. Rezultate pomnoževanja z vrstno specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki, ki nalegajo na gen *recA* smo potrdili z vrstno specifičnimi PCR reakcijami z oligonukleotidnimi začetniki, ki pomnožijo značilni odsek gena *fur* (Preglednica 19) (Slika 14).

Pri kliničnih izolatih enega izmed bolnikov nismo uspeli določiti vrste (Preglednica 19). Izolate smo identificirali z metodo določanja nukleotidnega zaporedja s protokolom, ki so ga opisali Mahenthiralingam in sod. (2000). Z oligonukleotidi BCR1 in BCR4 ter BCR2 in BCR3 smo določili nukleotidno zaporedje 1043 bp dolgega odseka gena *recA*, ki je pridelek PCR *B. cepacia* kompleks specifičnega PCR. Z vrstno specifičnimi protokoli PCR nismo uspeli identificirati teh izolatov, ker gre najverjetneje za eno od novih vrst kompleksa *B. cepacia*, ki jo je šele nedavno z MLST analizo opredelil Mahenthiralingam s sodelavci (2009). Metoda določanja nukleotidnega zaporedja gena *recA* ima pomembno vlogo pri identifikaciji novih vrst kompleksa *B. cepacia*, za katere ni oblikovanih specifičnih oligonukleotidnih začetnikov, ki bi omogočali identifikacijo do nivoja vrste z metodo PCR.

S fenotipskimi identifikacijskimi sistemi pogosto napačno identificiramo *B. gladioli* kot *B. cepacia*, kar smo potrdili tudi v naši raziskavi. Med vrstami rodu *Burkholderia* je *B. gladioli*, poleg bakterij kompleksa *B. cepacia*, najverjetnejši povzročitelj okužb dihal pri bolnikih s cistično fibrozo. Zaradi tega smo bakterijske izolate, ki jih nismo uvrstili v kompleks *B. cepacia*, poskušali pomnožiti s PCR protokolom specifičnim za *B. gladioli* (Preglednica 20). Referenčni izolat medicinsko pomembne bakterije *B. gladioli* smo hitro in zanesljivo opredelili s specifičnim PCR protokolom, pri katerem smo z oligonukleotidnima začetnikoma LP1 in LP4 pomnožili odsek gena 23S rRNA. Na enak način smo identificirali tudi 7 kliničnih izolatov (KI1, KI2, KI3, KI7, KI8, KI9 in KI10), ki so bili predhodno fenotipsko opredeljeni kot *B. cepacia* ali nefermentativni po Gramu

negativni bacili. PCR metoda je bila specifična za *B. gladioli*, saj oligonukleotidna začetnika nista pomnožila izolatov kompleksa *B. cepacia* (*B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*) ter izolatov drugih po Gramu negativnih bakterij (*S. maltophilia*, *C. testosteroni*, *P. pnomenusa*, *A. xylosoxidans* in *A. iwoffii*). Presenetljivo je, da večina naših kliničnih izolatov pripada vrsti *B. gladioli* in ne kompleksu *B. cepacia* (Preglednica 21).

Razviti molekularni algoritem temelji na zaporednih PCR reakcijah, s katerimi lahko do vrste opredelimo bakterije kompleksa *B. cepacia* in bakterijo *B. gladioli* (Slika 15). Prednosti molekularnega pristopa v primerjavi s fenotipskim pristopom so številne. Z molekularnim algoritmom identificiramo bakterijske izolate do vrste ter se izognemo lažno pozitivnim ali lažno negativnim rezultatom, ki so posledica fenotipske podobnosti bakterij kompleksa *B. cepacia* in drugih po Gramu negativnih bakterij. V primerjavi s klasično bakteriološko diagnostiko je molekularni pristop bolj zanesljiv, občutljiv in specifičen.

Prav tako kot vse metode ima tudi molekularni pristop svoje pomanjkljivosti in sicer so slabost lažno pozitivni ali lažno negativni rezultati. Le-tem se izognemo z vključitvijo negativne in pozitivne kontrole pomnoževanja ter z zmanjšanjem možnosti kontaminacije pri izolaciji bakterijske DNA in pri pripravi reakcijske mešanice. Slabost molekularne identifikacije je v primerjavi s klasično bakteriološko diagnostiko tudi cena, saj molekularni algoritem vključuje več PCR postopkov in v končni fazi tudi sekveniranje, če izolata ne uspemo identificirati z opisanim algoritmom protokolov PCR.

5.2 SKLEPI

V diplomski nalogi smo oblikovali algoritem molekularnih metod za identifikacijo medicinsko pomembnih bakterij kompleksa *B. cepacia* in bakterije *B. gladioli*, ki je izvedljiv v rutinskem laboratoriju.

Selektivno gojišče BCA omogoča uspešno kultivacijo bakterij kompleksa *B. cepacia*. Gojišče ni 100 % specifično saj na njem porastejo tudi nekatere druge po Gramu negativne bakterije: *B. gladioli*, *C. meningosepticum*, *P. pnomenusa*, *S. maltophilia* in *I. limosus*.

Identifikacija bakterij kompleksa *B. cepacia* in *B. gladioli* s komercialnima identifikacijskima sistemoma BBL Crystal E/NF in ID 32 GN ni zanesljiva, saj:

- ne omogoča identifikacije vseh izolatov kompleksa *B. cepacia*,
- kot *B. cepacia* napačno opredeli izolate drugih rodov po Gramu negativnih bakterij,
- ne omogoča ločevanja med vrstami kompleksa *B. cepacia* in
- ne identificira bakterije *B. gladioli*.

Algoritem molekularnih testov zanesljivo identificira bakterije kompleksa *B. cepacia* in *B. gladioli*. Bakterijske izolate identificiramo:

- do nivoja kompleksa *B. cepacia* s protokolom PCR specifičnim za *B. cepacia* kompleks (BCR1/BCR2),
- z večkratnim PCR opredelimo vrste kompleksa *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB in *B. dolosa* ter
- z vrstno specifičnimi protokoli PCR vrste *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. ambifaria*, *B. anthina* in *B. pyrrocinia*.

V primeru negativnega rezultata opredelitve kompleksa *B. cepacia* najprej izvedemo PCR specifičen za rod *Burkholderia* in v primeru pozitivnega rezultata pomnoževanja izvedemo PCR specifičen za *B. gladioli* ali ustrezen protokol določanja nukleotidnega zaporedja.

6 POVZETEK

Bakterije kompleksa *B. cepacia* so oportunistični patogeni, ki povzročajo okužbe pri bolnikih s cistično fibrozo in imunokompromitiranih osebah. Okužba dihalne poti z bakterijo *B. cepacia* povzroči slabenje pljučne funkcije, poveča obolevnost in umrljivost bolnikov s cistično fibrozo. Bakterijski kompleks *B. cepacia* vključuje 17 fenotipsko podobnih vrst, ki se razlikujejo po patogenosti in sposobnosti širjenja med bolniki. Pravilna in hitra identifikacija vrst kompleksa *B. cepacia* predstavlja velik izziv, vendar je ključnega pomena za zdravljenje in preprečevanje širjenja bakterije v skupnosti bolnikov s cistično fibrozo. Diagnostika okužb z bakterijami kompleksa *B. cepacia* temelji na fenotipskem identifikacijskem pristopu, pri katerem bakterije osamimo na selektivnem gojišču ter jih identificiramo do nivoja kompleksa *B. cepacia* s komercialno dostopnimi identifikacijskimi sistemi, dobljene rezultate pa lahko dodatno potrdimo z biokemičnimi testi. Vrste kompleksa *B. cepacia* s fenotipskimi identifikacijskimi sistemi ni mogoče ločiti, le-to pa dosežemo z molekularnim pristopom.

V diplomski nalogi smo oblikovali algoritem molekularnih testov za identifikacijo vrst kompleksa *B. cepacia* ter bakterijo *B. gladioli*. Dodatno smo preverili zanesljivost identifikacije bakterij *B. cepacia* s fenotipskim identifikacijskim pristopom, ki vključuje osamitev bakterije na selektivnem gojišču BCA ter identifikacijo s komercialnima identifikacijskima sistemoma BBL Crystal E/NF in ID 32 GN ter dodatnimi biokemičnimi testi.

Bakterije kompleksa *B. cepacia* porastejo na selektivnem gojišču BCA, ki podpira rast tudi nekaterih drugih po Gramu negativnih bacilov. Identifikacija bakterij *B. cepacia* s fenotipskimi identifikacijskimi sistemi ni zanesljiva in odpove pri identifikaciji bakterije *B. gladioli*. Izoblikovan algoritem molekularnih testov se je izkazal za zanesljivejšo, bolj občutljivo in specifično metodo dokazovanja okužb z bakterijami kompleksa *B. cepacia* in *B. gladioli*. Z molekularnim pristopom smo identificirali *B. gladioli* in bakterije kompleksa *B. cepacia* do nivoja vrste in ovrgli lažno pozitivne rezultate, ki so bili rezultat identifikacije s fenotipskimi metodami.

7 VIRI

Baldwin A., Mahenthiralingam E., Thickett K.M., Honeybourne D., Maiden M.C.J., Govan J.R., Speert D.P., LiPuma J.J., Vandamme P., Dowson C.G. 2005. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 9: 4665-4673

Borinc Beden A., Breclj J., Bratanič N., Homan M., Homšak M., Jenko K., Kenig A., Oštir M., Skočir L., Širca Čampa A. 2008. Smernice za obravnavo otrok s cistično fibrozo. *Zdravniški vestnik*, 77: 679-692

Burns J.L., Jonas M., Chi E.Y., Clark D.K., Berger A., Griffith A. 1996. Invasion of respiratory epithelial cells by *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*. *Infection and Immunity*, 46, 10: 4054-4059

BioMérieux. 2009. *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* isolation media. Technical data sheet 640 Rev.5. Winsolville, BioMérieux, inc: 3 str.
<http://www.pmlmicro.com/assets/TDS/640.pdf> (22. dec. 2009)

Chiarini L., Bevivino A., Dalmastrì C., Tabacchioni S., Visca P. 2006. *Burkholderia cepacia* complex species: Health hazards and biotechnological potential. *Trends in Microbiology*, 14: 277-286

Coenye T., Schouls L.M., Govan J.R., Kersters K., Vandamme P. 1999. Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1657-1666

Coenye T., Falsen E., Hoste B., Ohlen M., Goris J., Govan J.R., Gillis M., Vandamme P. 2000. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenusa* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 887-899

Coenye T., Vandamme P., Govan J.R., LiPuma J.J. 2001a. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3427-3436

Coenye T., LiPuma J.J., Henry D., Hoste B., Vandemeulebroucke K., Gillis M., Speert D.P., Vandamme P. 2001b. *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 271-279

Coenye T., Mahenthiralingam E., Henry D., LiPuma J.J., Laevens S., Gillis M., Speert D.P., Vandamme P. 2001c. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1481-1490

Davies J.C., Rubin B.K., Engr M. 2007. Emerging and unusual Gram-negative infections in cystic fibrosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 28: 312-321

Denton M., Kerr K.G. 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 57-80

Drevinek P., Baldwin A., Dowson C.G., Mahenthiralingam E. 2008. Diversity of the *parB* and *repA* genes of the *Burkholderia cepacia* complex and their utility for rapid identification of *Burkholderia cenocepacia*. *BMC Microbiology*, 8: 44, doi: 10.1186/1471-2180-8-44: 10 str.

Gibson R.L., Burns J.L., Ramsey B.W. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168: 918-951

Gillis M., Van Van T., Bardin R., Goor M., Hebbar P., Willems A., Segers P., Kersters K., Heulin L.T., Fernandez M.P. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia*

vietnamiensis sp. nov. for N-2-fixing isolates from rice in Vietnam. International Journal of Systematic Bacteriology, 45, 2: 274-289

Govan J.R., Hugnes J.E., Vandamme P. 1996. *Burkholderia cepacia*: Medical, taxonomic and ecological issues. Journal of Medical Microbiology, 45: 395-407

Harrison F. 2007. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. Microbiology, 153: 917-923

Henry D.A., Campbell M.E., LiPuma J.J., Spert D.P. 1997. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. Journal of Clinical Microbiology, 35: 614-619

Henry D.A., Mahenthiralingam E., Vandamme P., Coenye T., Speert, D.P. 2001. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. Journal of Clinical Microbiology, 39, 3: 1073-1078

Hutchison M.L., Govan J.R. 1999. Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. Microbes and Infection, 1, 12: 1005-1014

Jolley K., Chan M.S., Maiden M.C.J. 2004. *Burkholderia cepacia* complex multilocus sequence typing. BMC Bioinformatics, 5: 86, doi:10.1186/1471-2105-5-86: 8 str.

Jones A.M., Dodd M.E., Webb A.K. 2000. *Burkholderia cepacia*: Current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. European Respiratory Journal, 17: 295-301

Jones A.M., Dodd M.E., Govan J.R.W., Barcus V., Doherty C.J., Morris J., Webb A.K. 2004. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: Influence on survival in cystic fibrosis. Thorax, 59, 11: 948-951

LiPuma J.J., Dulaney B.J., Mcmenamin J.D., Whitby P.W., Stull T.L., Coenye T., Vandamme P. 1999. Development of rRNA-based PCR assays for identification of

Burkholderia cepacia complex isolates recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 10: 3167-3170

LiPumma J.J. 2003. *Burkholderia* and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 24, 6: 681-692

LiPuma J.J., Currie B.J., Lum G.D., Vandamme P.A.R. 2007. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, and *Acidovorax*. V: *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., Pfaller M.A. (eds.). Washington, ASM Press: 749-769

Lynch K.H., Dennis J.J. 2008. Development of a species-specific *fur* gene-based method for identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 2: 447-455

Mahenthiralingam E., Bischof J., Byrne S.K., Radomski C., Davies J.E., Av-Gay Y., Vandamme P. 2000. 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*, 38, 9: 3165-3173

Mahenthiralingam E., Vandamme P., Campbell M.E., Henry D.A., Gravelle A.M., Wong L.T., Davidson A.G., Wilcox P.G., Nakielna B., Speert D.P. 2001. Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: Virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. *Clinical Infectious Diseases*, 33, 9: 1469-1475

Mahenthiralingam E., Urban T.A., Goldberg J.B. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 144-156

Mahenthiralingam E., Baldwin A., Dowson C.G. 2008. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: Opportunistic pathogens with important natural biology. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1539-1551

Mahenthiralingam E. 2009. *Burkholderia cenocepacia* strain N1 RecA gene. Cardiff, Cardiff School of Biosciences, Cardiff University: 1 str. (osebni vir, september 2009)

Martin D.W., Mohr C.D. 2000. Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. *Infection and Immunity*, 68, 1: 24–29

McClean S., Callaghan M. 2009. *Burkholderia cepacia* complex: Epithelial cell– pathogen confrontations and potential for therapeutic intervention. *Journal of Medical Microbiology*, 58: 1–12

McDowell A., Mahenthiralingam E., Moore J.E., Dunbar K.E., Webb A.K., Dodd M.E., Martin S.L., Millar B.C., Scott C.J., Crowe M., Elborn J.S. 2001. PCR-based detection and identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 12: 4247-4255

McDowell A., Mahenthiralingam E., Dunbar K.E.A., Moore J.E., Crowe M., Elborn J.S. 2004. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: Issues related to patient segregation. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 663-668

McMenamin J.D., Zacccone T.M., Coenye T., Vandamme P., LiPuma J.J. 2000. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers. *Chest*, 117: 1661-1665

Miller M.B., Gilligan P.H. 2003. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 9: 4009-4015

Mohr C.D., Tomich M., Herfst C.A. 2001. Cellular aspects of *Burkholderia cepacia* infection. *Microbes and Infection*, 3: 425-435

Moore J.E., Millar B.C., Xu J., Crowe M., Redmond A.O.B., Elborn J.S. 2002. Misidentification of a genomovar of *Burkholderia cepacia* by *recA* restriction fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Pathology*, 55: 309-311

Palleron N.J. 2005. Genus *Burkholderia*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed. Vol. 2. Part C. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (eds.). New York, Springer: 575-600

Payne G.W., Vandamme P., Morgan S.H., LiPuma J.J., Coenye T., Weightman A.J., Jones T.H., Mahenthiralingam E. 2005. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7: 3917-3927

Saiman L., Siegal J. 2004. Infection control in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 1: 57-71

Segonds C., Heulin T., Marty N., Chabanon G. 1999. Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 7: 2201-2208

Shelly D.B., Spilker T., Gracely E.J., Coenye T., Vandamme P., LiPuma J.J. 2000. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 8: 3112-3115

Speert D.P. 2002. Advances in *Burkholderia cepacia* complex. *Paediatric Respiratory Reviews*, 3: 230-325

Spilker T., Baldwin A., Bumford A., Dowson C.G., Mahenthiralingam E., LiPuma J.J. 2009. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 8: 2607-2610

Vandamme P., Holmes B., Vancanneyt M., Coenye T., Hoste B., Coopman R., Revets H., Lauwers S., Gillis M., Kersters K., Govan J.R. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 4: 1188-1200

Vandamme P., Mahenthiralingam E., Holmes B., Coenye T., Hoste B., De Vos P., Henry D., Speert D.P. 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3: 1042-1047

Vandamme P., Henry D., Coenye T., Nzula S., Vancanneyt M., LiPuma J.J., Speert D.P., Govan J.R., Mahenthiralingam E. 2002. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 33: 143-149

Vandamme P., Holmes B., Coenye T., Goris J., Mahenthiralingam E., LiPuma J.J., Govan J.R. 2003. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. - a new twist to an old story. *Research in Microbiology*, 154: 91-96

Vanlaere E., LiPuma J.J., Baldwin A., Henry D., De Brandt E., Mahenthiralingam E., Speert D., Dowson C., Vandamme P. 2008. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1580-1590

Vanlaere E., Baldwin A., Gevers D., Henry D., De Brandt E., LiPuma J.J., Mahenthiralingam E., Speert D.P., Dowson C., Vandamme P. 2009. Taxon K, a complex

within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 102-111

Venturi V., Friscina A., Bertani I., Devescovi G., Aguilar C. 2004. Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. Research in Microbiology, 155: 238-244

Vermis K., Coenye T., LiPuma J.J., Mahenthiralingam E., Nelis H.J., Vandamme P. 2004. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 689-691

Vonberg R.P., Haussler S., Vandamme P., Steinmetz I. 2006. Identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens by rapid-cycle PCR with fluorescent hybridization probes. Journal of Medical Microbiology, 55: 721-727

Zuckerman J.B., Seder D.B. 2007. Infection control practice in cystic fibrosis centers. Clinics in Chest Medicine, 28: 381-404

Whitby P.W., Pope L.C., Carter K.B., LiPuma J.J., Stull T.L. 2000a. Species-specific PCR as a tool for the identification of *Burkholderia gladioli*. Journal of Clinical Microbiology, 38: 282-285

Whitby P.W., Carter K.B., Hatter K.L., Lipuma J.J., Stull T.L. 2000b. Identification of members of the *Burkholderia cepacia* complex by species-specific PCR. Journal of Clinical Microbiology, 38, 8: 2962-2965

Woods D.E., Sokol P.A. 2006. The genus *Burkholderia*. V: The prokaryotes. 3rd ed. Vol. 5. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer: 848-861

Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques, 39, 1: 75-85

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Katji Seme, dr. med., za strokovno vodenje, usmerjanje, koristne nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se somentorju dr. Boštjanu Kocjanu za vodenje pri praktični izvedbi diplomskega dela, za strokovne nasvete, vložen čas in potrpljenje.

Recenzentki prof. dr. Evi Ruzić-Sabljić, dr. med., se zahvaljujem za natančen in korekten pregled diplomske naloge.

Za vso pomoč, vzpodbudne besede, strokovne in koristne nasvete pri praktični izdelavi diplomske naloge bi se zahvalila Antoniji, Marji, Mrjetki, Petri in Poloni iz Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Največja zahvala gre mojim staršem in bratu, ki so mi skozi vsa leta študija stali ob strani, me spodbujali in verjeli vame.