

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Zorica V. Vasiljević**

**Fenotipska i genotipska karakterizacija  
bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa  
izolovanih kod pacijenata sa cističnom fibrozom**

**doktorska disertacija**

**Beograd, 2016**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**SCHOOL OF MEDICINE**

**Zorica V. Vasiljević**

**Phenotypic and genotypic characterization of  
*Burkholderia cepacia* complex bacteria isolated  
from cystic fibrosis patients**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2016**

## **MENTOR**

Prof. dr Slobodanka Đukić  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

## **KOMENTOR**

Prof. dr Branko Jovčić  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

## **ČLANOVI KOMISIJE**

Prof. dr Tatjana Pekmezović  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu  
predsednik komisije

Prof. dr Ivana Dakić  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Jelena Lozo  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: 19.9.2016.

## **Fenotipska i genotipska karakterizacija bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa izolovanih kod pacijenata sa cističnom fibrozom**

### **REZIME**

**Uvod:** Oštećenje respiratornog trakta usled hronične mikrobne kolonizacije i infekcije je glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta kod bolesnika sa cističnom fibrozom (CF). Procenjuje se da preko 80% osoba sa CF umire direktno ili indirektno od plućne bolesti. *Burkholderia cepacia* kompleks (Bck) čini jednu od najvažnijih grupa mikroorganizama koji uzrokuju infekciju u plućima obolelih od CF, praćenu neizvesnom prognozom i značajnim potencijalom za interhumani prenos. Infekcija respiratornog trakta izazvana Bck bakterijama može da perzistira mesecima ili godinama ili da bude udružena sa akutnom bolešću koja ugrožava život. Otkako su opisani prvi slučajevi tokom kasnih 1970-ih i ranih 1980-ih godina, prevalencija Bck infekcija u populaciji bolesnika sa CF je varirala između različitih zemalja i različitih centara za lečenje CF. Usled epidemijskog širenja infekcije, prevalencija je dostizala i 30%, na primer u Češkoj i Velikoj Britaniji. Visokotransmisivne i virulentne klonalne linije koje su izazivale epidemije pripadale su vrsti *B. cenocepacia*, a najrasprostranjeniji klonovi su ET12 (ST28), CZ1 (ST32), PHDC i Midwest. Iako je većina vrsta u okviru Bck potencijalno sposobna da izazove infekcije kod bolesnika sa CF, *B. cenocepacia* i *B. multivorans* su značajno zastupljenije od ostalih vrsta i zajedno su odgovorne za oko 70% svih Bck infekcija kod bolesnika sa CF. Od ranih 2000-ih godina, epidemiologija Bck se promenila u mnogim zapadnoevropskim zemljama, Kanadi i Sjedinjenim Američkim Državama, i prevalencija Bck kolonizacije sada iznosi između 1,4% i 6%, što je rezultat efikasnih mera prevencije. Međutim, podaci o prevalenciji i epidemiologiji Bck bakterija u zemljama Balkanskog poluostrva su oskudni.

**Ciljevi rada:** Cilj ove studije je bio da se ispituju prevalencija, epidemiološke karakteristike, prisustvo molekularnih markera udruženih sa virulencijom i transmisivnošću, osetljivost na antimikrobne lekove i sposobnost stvaranja biofilma kod izolata Bck bakterija u Centru za cističnu fibrozu Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“, koji je i nacionalni referentni centar za ovu bolest.

**Materijal i metode:** Izolati Bck bakterija sakupljeni tokom četvorogodišnjeg perioda trajanja studije (2010.–2013.) su analizirani PCR metodom za amplifikaciju gena za 16S rRNK, *recA* PCR metodom, elektroforezom na gelu u pulsirajućem polju (PFGE) genomske DNK, metodom tipizacije sekvenciranjem više lokusa (multilocus sequence typing, MLST), i filogenetskom analizom na osnovu konkatenata sekvenci sedam alela korišćenih u MLST

analizi. Kod odabranih izolata koji su prethodno karakterisani identifikacijom do nivoa vrste i genotipizacijom ispitivana je osetljivost na sedam antimikrobnih lekova E-testom. PCR skrining na osam genetičkih determinanti (*cblA*, BCESM, *cepI*, *cepR*, *fliG*, *llpE*, *wbiI*, *bcscV*) koje su povezane sa virulencijom izvršeno je na DNK 14 izolata reprezentativnih za svaki od genotipova.

**Rezultati:** Pedeset od 184 pacijenata (27,2%) bilo je kolonizovano dvema vrstama Bck bakterija, *B. cenocepacia* (n=49) i *B. stabilis* (n=1). Trideset četiri pacijenta (18,5%) su bila hronično kolonizovana. Metodama tipizacije utvrđeno je da postoji visok nivo sličnosti između većine *B. cenocepacia* izolata, što ukazuje na interhumani prenos ili zajednički izvor infekcije. Identifikovani su novi tipovi sekvenci (*sequence type*, ST), a nije pronađen nijedan od ST-ova sa internacionalnom distribucijom. Jedan ST, *B. cenocepacia* ST856, je bio izrazito dominantan i nađen je kod 48/50 (96%) pacijenata kolonizovanih Bck bakterijama. Kod ST856 je PCR metodom dokazano prisustvo markera epidemijskih sojeva *B. cepacia* (*B. cepacia epidemic strain marker*, BCESM) i “cable” pilina, i ustanovljeno je da je on genetički srodan epidemijskom soju CZ1 (ST32). Svi pacijenti su bili kolonizovani istim sojem tokom perioda istraživanja. Meropenem i ceftazidim su bili najefikasniji antibiotici *in vitro* sa 72,6% i 71,6% osetljivih izolata, tim redosledom. Uočena je značajna varijacija profila osetljivosti na antibiotike kod klonalnih izolata perzistentno inficiranih pacijenata. Većina Bck izolata (88%) je pokazala sposobnost produkcije biofilma *in vitro*.

**Zaključak:** Ovi rezultati ukazuju da je zastupljenost kolonizacije disajnih puteva Bck bakterijama kod pacijenata sa CF u Srbiji visoka i skoro isključivo ograničena na jedan klon *B. cenocepacia*. Utvrđeno je prisustvo visokotransmisivnog klona i verovatan interhumani prenos.

**Ključne reči:** *Burkholderia cepacia* kompleks; cistična fibroza; bakterijska genotipizacija; MLST; *Burkholderia cenocepacia* ST856

**Naučna oblast:** Biomedicinske nauke

**Uža naučna oblast:** Molekularna mikrobiologija

**UDK broj:**

## **Phenotypic and genotypic characterization of *Burkholderia cepacia* complex bacteria isolated from cystic fibrosis patients**

### **ABSTRACT**

**Introduction:** The respiratory tract impairment due to chronic microbial colonization and infection is a major cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) patients. It is estimated that over 80% of individuals with CF die directly or indirectly from pulmonary disease. The *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) is one of the most important groups of organisms causing infection in the CF lung, associated with a dubious prognosis and patient-to-patient transmissibility. Respiratory tract infection may persist for months or years or be associated with acute life-threatening illness. Since the first cases were described in the late 1970s and early 1980s, the reported prevalence of Bcc in CF population varied between different countries and CF care centres reaching up to 30%, e.g. in the Czech Republic and the United Kingdom due to the epidemic spread. The highly transmissible and virulent clonal lineages associated with outbreaks belong to *B. cenocepacia*, and the most successful are ET12 (ST28), CZ1 (ST32), PHDC and Midwest clones. Although most species within Bcc are potentially capable of causing infections in CF patients, *B. cenocepacia* and *B. multivorans* are significantly more common than the remaining species and together they account for around 70% of all Bcc infections in the course of CF. Since the early 2000s the epidemiology of the Bcc has changed. In many Western European countries as well as in Canada and the United States, overall Bcc prevalence rates decreased and now range from 1.4% to around 6% as a result of effective prevention strategies. Notwithstanding, data regarding prevalence and epidemiology of Bcc in countries on the Balkan Peninsula is scarce.

**Objectives:** The aim of this study was to evaluate the prevalence, epidemiological characteristics, presence of molecular markers associated with virulence and transmissibility, antimicrobial susceptibility and biofilm formation capacity of the Bcc strains in the National Cystic Fibrosis Centre which is located at the Mother and Child Health Care Institute of Serbia “Dr. Vukan Cupic”, a university-affiliated tertiary care paediatric hospital in Belgrade.

**Materials and methods:** The Bcc isolates collected during the four-year study period (2010–2013) were further examined by 16s rRNA gene, *recA* PCR, pulsed-field gel electrophoresis of genomic DNA, multilocus sequence typing analysis, and phylogenetic analysis based on concatenated sequence of seven alleles. Selected isolates, previously characterized with respect to the species status and the genotype, were tested for their susceptibility to seven antimicrobials using the E-test method. PCR screenings of eight genetic determinants (*cbIA*,

BCESM, *cepI*, *cepR*, *fliG*, *llpE*, *wbiI*, *bpscV*) associated with virulence were performed on genomic DNA extracted from the 14 isolates representative of all genotypes.

**Results:** Fifty out of 184 patients (27.2%) were colonized with two Bcc species, *B. cenocepacia* (n=49) and *B. stabilis* (n=1). Thirty-four patients (18.5%) had chronic colonization. Typing methods revealed a high level of similarity among *B. cenocepacia* isolates, indicating a person-to-person transmission or acquisition from a common source. New sequence types (STs) were identified, and none of the STs with an international distribution were found. One centre-specific ST, *B. cenocepacia* ST856, was highly dominant and shared by 48/50 (96%) patients colonized by Bcc. This clone was characterized by PCR positivity for both the *B. cepacia* epidemic strain marker and cable pilin, and showed close genetic relatedness to the epidemic strain CZ1 (ST32). All patients harboured genetically similar strains throughout the period of observation. Meropenem and ceftazidime were the most effective antimicrobials tested *in vitro*, with 72.6% and 71.6% of the isolates being susceptible to these compounds, respectively. A significant variation of the antimicrobial susceptibility pattern of clonal isolates obtained from persistently infected patients was registered. The majority of the Bcc isolates (88%) were capable of forming biofilm *in vitro*.

**Conclusions:** These results indicate that the impact of Bcc on airway colonization in the Serbian CF population is high and virtually exclusively limited to a single clone of *B. cenocepacia*. The presence of a highly transmissible clone and probable patient-to-patient spread was observed.

**Keywords:** *Burkholderia cepacia* complex; cystic fibrosis; bacterial genotyping; MLST; *Burkholderia cenocepacia* ST856

**Scientific field:** Biomedical Sciences

**Scientific subfield:** Molecular Microbiology

**UDC number:**

## SADRŽAJ

1 UVOD.....	1
1.1 Cistična fibroza.....	1
1.1.1 Respiratorne infekcije kod pacijenata obolelih od CF.....	2
1.2 Infekcije izazvane bakterijama <i>Burkholderia cepacia</i> kompleksa kod pacijenata sa CF .....	3
1.2.1 <i>Burkholderia cepacia</i> kompleks i bolest pluća kod CF.....	3
1.2.2 Ostale oportunističke infekcije izazvane bakterijama <i>B. cepacia</i> kompleksa .	5
1.3 Karakteristike bakterija <i>Burkholderia cepacia</i> kompleksa .....	6
1.3.1 Taksonomija i nomenklatura .....	6
1.3.2 Morfološke i kulturelne osobine.....	8
1.3.3 Rasprostranjenost, ekologija i biotehnološki značaj.....	8
1.3.4 Širenje bakterija <i>B. cepacia</i> kompleksa.....	9
1.4 Laboratorijska dijagnostika respiratornih infekcija izazvanih bakterijama <i>B. cepacia</i> kompleksa kod pacijenata sa CF .....	12
1.4.1 Izolacija bakterija <i>B. cepacia</i> kompleksa .....	12
1.4.2 Metode identifikacije bakterija <i>B. cepacia</i> kompleksa.....	13
1.4.3 Metode tipizacije <i>B. cepacia</i> kompleksa .....	14
1.5 Epidemiologija <i>B. cepacia</i> kompleksa nekad i sad .....	16
1.5.1 Doprinos metode tipizacije sekvenciranjem više lokusa (MLST) ispitivanju epidemiologije <i>B. cepacia</i> kompleksa .....	18
1.5.2 Epidemiološka situacija u Srbiji .....	19
1.6 Virulencija i patogenetski potencijal <i>B. cepacia</i> kompleksa.....	21
1.6.1 Organizacija genoma bakterija <i>B. cepacia</i> kompleksa.....	22
1.6.2 Genomska ostrva i mobilni elementi.....	22



1.6.3 Adaptivni odgovor.....	23
1.6.4 Pokretljivost i faktori adhezivnosti.....	24
1.6.5 Faktori invazivnosti i intracelularno preživljavanje.....	26
1.6.6 Quorum sensing.....	28
1.6.7 Načini preuzimanja gvožđa.....	29
1.6.8 Površinski polisaharidi.....	29
1.6.9 Ostali faktori virulencije.....	30
1.6.10 Biofilm.....	31
1.7 Osetljivost bakterija <i>B. cepacia</i> kompleksa na antimikrobne agense.....	31
1.8 Radna hipoteza.....	32
2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	33
3 MATERIJAL I METODE.....	34
3.1 Poreklo i izolacija sojeva.....	34
3.1.1 Bolesnici i period istraživanja.....	34
3.1.2 Definicija kolonizacije bakterijama <i>B. cepacia</i> kompleksa.....	34
3.1.3 Bakterijski izolati.....	34
3.2 Fenotipska identifikacija izolata.....	35
3.3 Genotipizacija izolata elektroforezom na gelu u pulsirajućem polju (PFGE).....	35
3.4 Identifikacija genotipova do nivoa vrsta <i>B. cepacia</i> kompleksa molekularnim metodama i molekularna tipizacija.....	36
3.4.1 PCR metoda za amplifikaciju gena za 16S rRNK.....	36
3.4.2 PCR metoda za amplifikaciju <i>recA</i> gena.....	37
3.4.3 Filogenetska analiza <i>recA</i> gena.....	38
3.4.4 Molekularna tipizacija sojeva MLST metodom.....	39
3.4.5 Filogenetska analiza na osnovu konkatenata sekvenci sedam alela korišćenih u MLST analizi.....	41

3.4.6 PCR analiza sa prajmerima specifičnim za <i>B. cenocepacia</i> ST32 .....	42
3.5 Ispitivanje prisustva markera epidemijskih sojeva, „cable“ pila i BCESM .....	43
3.6 Ispitivanje patogenog potencijala izolata detekcijom gena odgovornih za faktore virulencije .....	44
3.7 Metode rada sa DNK .....	46
3.7.1 Izolacija ukupne bakterijske DNK .....	46
3.7.2 Elektroforeza DNK.....	47
3.7.3 Elucija DNK fragmenata .....	47
3.8 Formiranje biofilma.....	48
3.9 Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove .....	49
3.9.1 Ispitivanje osetljivosti na antibiotike disk difuzionom metodom.....	49
3.9.2 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije E-testom.....	49
3.10 Obrada rezultata.....	51
4 REZULTATI .....	52
4.1 Bolesnici .....	52
4.2 Prevalencija i incidencija kolonizacije bakterijama <i>B. cepacia</i> kompleksa .....	52
4.3 Bakterijski izolati.....	53
4.4 Genotipizacija PFGE metodom.....	54
4.5 Molekularno-genetička analiza .....	56
4.5.1 Identifikacija sekvenciranjem gena za 16S rRNK.....	56
4.5.2 Sekvenciranje <i>recA</i> gena i filogenetska analiza sekvenci <i>recA</i> gena .....	56
4.5.3 Tipizacija sojeva MLST metodom .....	58
4.5.4 PCR specifičan za <i>B. cenocepacia</i> ST32.....	60
4.6 Epidemijski markeri “cable” pilin i BCESM .....	61
4.7 Detekcija gena odgovornih za faktore virulencije.....	61
4.8 Formiranje biofilma.....	63

4.9 Evaluacija osetljivosti na antibiotike E-testom .....	65
5 DISKUSIJA .....	72
6 ZAKLJUČCI .....	96
7 LITERATURA .....	98

# 1 UVOD

## 1.1 Cistična fibroza

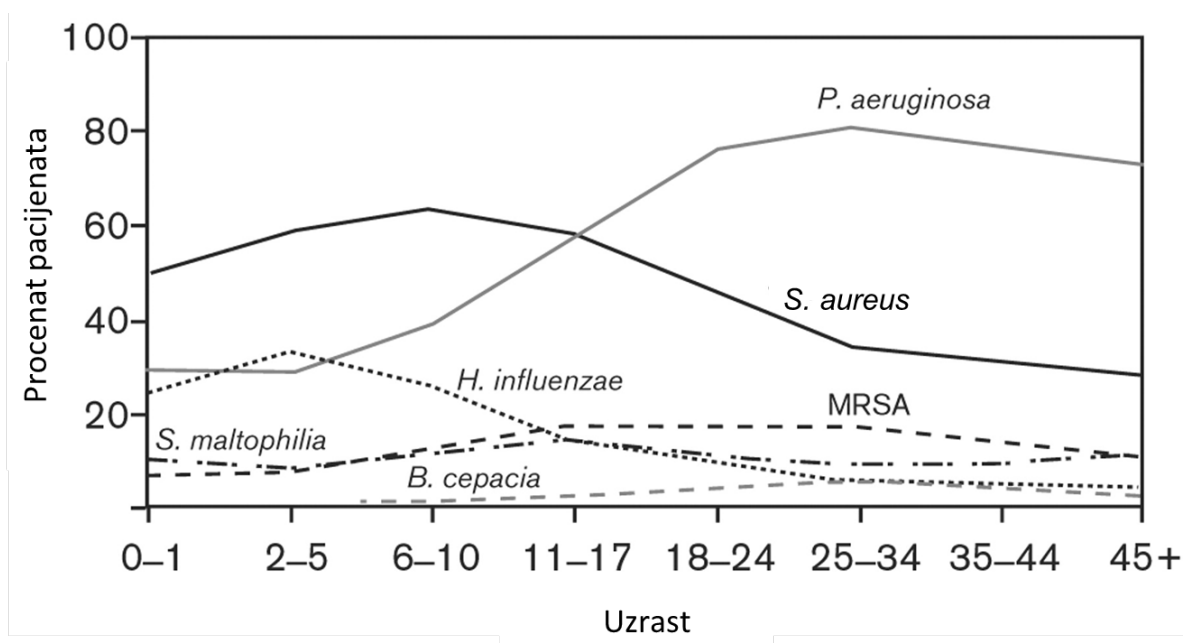
Cistična fibroza (CF) je najčešća monogenska nasledna bolest ljudi bele rase koja se nasleđuje autozomno-recesivno, sa učestalošću od oko 1:2500 živorođene dece i visokom frekvencijom (4–5%) heterozigotnih nosilaca u opštoj populaciji (Govan et Deretic, 1996). Prema podacima Evropskog društva za cističnu fibrozu (engl. *European Cystic Fibrosis Society*, ECFS) za 2010. godinu, u Evropi je registrovano preko 32000 obolelih od ove bolesti (Zolin et al., 2014). To je hronično, progresivno, multisistemsko oboljenje koje je posledica jedne ili više mutacija u *cftr* genu koji kodira protein regulator transmembranske provodljivosti (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR). Ovaj protein formira hloridni kanal sa funkcijom u regulaciji transporta jona kroz ćelijsku membranu. Mutacije u genu za CFTR protein uzrokuju poremećaj regulacije transporta jona natrijuma i hlora i posledičnu dehidraciju sekreta koji normalno oblaže površinu disajnih puteva, dovodeći do stvaranja viskoznog mukusnog sloja koji ne može lako da se evakuiše. U gustom sekretu koji se nagomilava i adherira za površinu epitela u plućima bakterije ostaju zarobljene što dovodi do hroničnih respiratornih infekcija izazvanih oportunističkim bakterijskim patogenima (Cantón et del Campo, 2010). Epitelne ćelije u drugim delovima tela su takođe pogođene usled sinteze nefunkcionalnog CFTR proteina što može da dovede do poremećaja funkcije egzokrinih žlezda kao što su pankreas, znojne žlezde i gonade (Ratjen et Döring, 2003).

### 1.1.1 Respiratorne infekcije kod pacijenata obolelih od CF

Oštećenje respiratornog trakta usled hronične mikrobne kolonizacije i infekcije je glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta kod pacijenata sa CF. Procenjuje se da preko 80% osoba sa CF umire direktno ili indirektno od bolesti pluća. Infekcije počinju rano u detinjstvu i imaju tendenciju da postanu perzistentne (Hauser et al., 2011). Spektar najznačajnijih uzročnika respiratornih infekcija je iznenađujuće uzak, ali su infekcije obično polimikrobne (Rabin et Surette, 2012). U prvim godinama života najčešći uzročnici su *Staphylococcus aureus* i neinkapsulirani sojevi *Haemophilus influenzae*, a kasnije oportunističke bakterije od kojih je najznačajniji *Pseudomonas aeruginosa* (Slika 1). Drugi oportunistički patogeni uključuju nozokomijalne patogene kao što su *Stenotrophomonas maltophilia* i *Achromobacter xylosoxidans*, i vrste koje se retko sreću kao uzročnici infekcija kod ljudi osim kod obolelih od CF, kao što su bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa (Bck), *Burkholderia gladioli*, *Ralstonia* spp., *Cupriavidus* spp., *Pandoraea* spp. i dr. (LiPuma, 2010). Brojna istraživanja prirode uzročnika respiratornih infekcija kod pacijenata sa CF u velikoj meri su rasvetlila specifičnosti infekcija u ovoj grupi pacijenata u odnosu na druge vrste respiratornih infekcija i pružila uvid u kompleksnost i adaptacione mehanizme uzročnika. Mada je kolonizacija nekima od ovih vrsta udružena sa nepovoljnim ishodom, za druge nije sasvim jasno kakvu ulogu imaju u progresiji bolesti (LiPuma, 2010).

Pojednostavljeno tumačenje plućnih manifestacija kod pacijenata sa CF je da su one posledica neefikasnosti mukocilijarnog sistema u eliminaciji mikroorganizama koji zatim prodiru u donje respiratorne puteve. Međutim, verovatno se radi o kompleksnijem procesu. Ustanovljena je smanjena aktivnost proteina surfaktanta i prirodnih peptida sa lokalnom antimikrobnom aktivnošću kao što su defenzini. Obe pojave olakšavaju hroničnu bakterijsku kolonizaciju i infekciju i, takođe, umanjuju efikasnost prirodnih mehanizama odbrane (Cantón et del Campo, 2010). Pored toga, nedovoljno poznatim mehanizmima, mutacije u genu za CFTR protein uzrokuju urođeno hiperinflamatorno stanje u disajnim putevima osoba sa CF, sa obiljem neutrofila i proinflatarnih citokina, što dovodi do oštećenja ćelija domaćina i dodatno ometa procese eliminisanja mikroorganizama (Hauser et al., 2011). Konstantna interakcija između infekcije i

inflamacije u disajnim putevima je ključna karakteristika bolesti pluća kod obolelih od CF (Hector et al., 2016).



**Slika 1.** Grafički prikaz prevalencije bakterijskih respiratornih infekcija kod bolesnika sa CF prema uzrasnim grupama. MRSA, meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus* (Preuzeto iz Harrison, 2007)

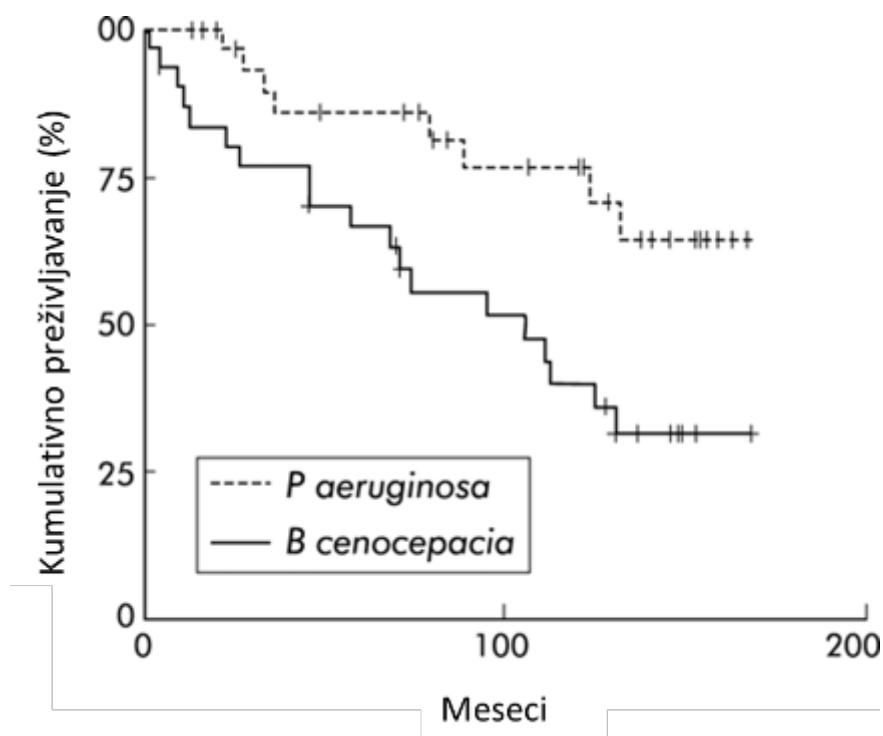
## 1.2 Infekcije izazvane bakterijama *Burkholderia cepacia* kompleksa kod pacijenata sa CF

### 1.2.1 *Burkholderia cepacia* kompleks i bolest pluća kod CF

*Burkholderia cepacia* kompleks predstavlja jednu od najznačajnijih grupa mikroorganizama koji uzrokuju infekcije u plućima bolesnika sa CF zbog neizvesne prognoze, multirezistencije na antibiotike i značajnog potencijala za interhumani prenos u ovoj grupi bolesnika, što je dokazano brojnim studijama. Respiratorna infekcija može da perzistira mesecima i godinama ili da ima akutni tok praćen često smrtnim ishodom (Isles et al., 1984; Ledson et al., 2002).

Isles i saradnici (1984) su prvi opisali pojavu brzoprogredirajućeg pogoršanja respiratorne funkcije praćenog često fatalnom nekrotizirajućom pneumonijom, bakterijemijom i sepsom koje je uzrokovala do tada retko izolovana bakterija *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* (kasnijim taksonomskim studijama utvrđeno je da se radilo o vrsti *B. cenocepacia* koja pripada Bck). Ovaj tzv. “cepacia sindrom” je uočen kod čak 20% inficiranih pacijenata, dok se kod drugih i pored kolonizacije održavala dosta stabilna plućna funkcija ili je dolazilo do njenog postepenog, ali progresivnog pogoršavanja. “Cepacia sindrom” je demonstrirao sposobnost *B. cepacia* da izazove invazivnu i sistemsku infekciju koja nije uočena kod drugih CF patogena. U više studija je pokazano da je smrtnost bila veća i prosečna dužina preživljavanja manja kod pacijenata kolonizovanih *B. cepacia* nego kod pacijenata kolonizovanih *P. aeruginosa* (Slika 2) (Thomassen et al. 1985; Jones et al., 2004). Međutim, klinički ishod kolonizacije i infekcije izazvane *B. cepacia* nije mogao da se predvidi kod svakog pojedinačnog bolesnika, čak i kada su pacijenti bili inficirani istim sojem. Poražavajući efekti *B. cepacia* infekcija kod obolelih od CF su bili praćeni ozbiljnim psihosocijalnim posledicama i osećanjem izolovanosti i straha kod bolesnika koji su zbog svoje hronične bolesti već izloženi brojnim teškoćama i izazovima (Duff, 2002).

Kolonizacija Bck bakterijama predstavlja otežavajuću okolnost pri donošenju odluke o transplantaciji pluća jer dugoročno preživljavanje zavisi od statusa kolonizacije pre operacije. Podaci o ishodu ove intervencije se značajno razlikuju u različitim studijama, od onih gde je mortalitet nakon godinu dana bio između 50% i 100%, ali bilo je i studija gde je preživljavanje iznosilo >75%. Najveći mortalitet je bio kod pacijenata kolonizovanih sojevima *B. cenocepacia* (De Soyza et al., 2001, Chaparro et al., 2001, Boussaud et al., 2008).



**Slika 2.** Grafički prikaz stope preživljavanja pacijenata sa CF u grupi sa hroničnom *B. cenocepacia* infekcijom i kontrolnoj grupi sa hroničnom *P. aeruginosa* infekcijom (n=31 u svakoj grupi) (Preuzeto iz Jones et al., 2004)

### 1.2.2 Ostale oportunističke infekcije izazvane bakterijama *B. cepacia* kompleksa

Nozokomijalne infekcije izazvane Bck bakterijama, od kojih je najčešća bakterijemija, u najvećem broju slučajeva su posledica kontaminacije antiseptika, infuzionih rastvora, različitih farmaceutskih preparata, sredstava za higijenu i kozmetičkih preparata (Mahenthiralingam et al., 2008; Kim et al., 2015; Magalhães et al., 2003; Sousa et al., 2011). Faktori rizika za nastanak nozokomijalnih infekcija obuhvataju hemodijalizu, boravak u jedinicama intenzivne nege, implantaciju centralnog venskog katetera, stalni urinarni kateter i mehaničku ventilaciju (Mann et al., 2010; Bressler et al., 2007; Hanulik et al., 2013).

Uočena je povezanost između infekcija izazvanih Bck bakterijama i hronične granulomatozne bolesti jer kod ovih pacijenata postoji urođeni poremećaj funkcije neutrofila u kojima ne dolazi do ubijanja ingestiranih bakterija (Song et al., 2011).



### 1.3 Karakteristike bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa

#### 1.3.1 Taksonomija i nomenklatura

*Pseudomonas cepacia* je prvobitno opisan kao patogen crnog luka a tokom niza godina je sporadično izolovan kao izazivač infekcija kod ljudi, tipično kod pacijenata sa oslabljenim imunitetom i hroničnim oboljenjima (LiPuma, 2010). Kasnije je uvršten u rod *Burkholderia* koji je ustanovljen 1992. godine i tada se sastojao od sedam vrsta koje su prethodno bile klasifikovane u rod *Pseudomonas*, grupu II na osnovu homologije gena za ribozomalne RNK (Yabuuchi et al., 1992). Daljim taksonomskim studijama identifikovane su brojne dodatne *Burkholderia* vrste pa ovaj rod trenutno obuhvata preko 90 vrsta, a većina se nalazi u spoljašnjoj sredini i nije patogena za zdrave ljude (<http://www.bacterio.net>).

Sredinom 1990-ih godina, Vandamme i saradnici (1997) su izvršili detaljnu taksonomsku analizu koja je pokazala da sojevi *B. cepacia* zapravo obuhvataju nekoliko različitih vrsta koje pokazuju neuobičajeno visoku genetičku srodnost i formiraju različite filogenetske grupe u okviru roda *Burkholderia*. Po taksonomskoj konvenciji te vrste su nazivane “genomovarovima” dok nisu identifikovane specifične fenotipske karakteristike koje su omogućile da svaka nova vrsta dobije formalni binomijalni naziv. Trenutno postoji najmanje 20 vrsta koje su dobile kolektivni naziv *B. cepacia* kompleks kao sinonim za *B. cepacia* “sensu lato” (Tabela 1). Nekoliko Bck vrsta može da izaziva hronične i često teške infekcije respiratornog trakta kod osoba sa CF. Najčešće izolovane vrste su *B. cenocepacia* i *B. multivorans*. Druge vrste su mnogo ređe, mada se *B. cepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* i *B. dolosa* generalno češće izoluju od *B. ambifaria*, *B. anthina* i *B. pyrrocinia* (Planet et Saiman, 2010).

Od ostalih *Burkholderia* vrsta koje ne pripadaju Bck, samo za *B. gladioli*, *B. fungorum* i *B. pseudomallei* je dokazano da mogu da uzrokuju infekcije kod pacijenata sa CF (LiPuma, 2010). *B. pseudomallei* je uzročnik melioidoze kod ljudi i životinja. Nalazi se kao saprofit u zemljištu i vodi u tropskim predelima gde je melioidoza endemsko oboljenje, uglavnom u Jugoistočnoj Aziji i na severu Australije. Iako retko, opisani su slučajevi bronhopulmonalnih infekcija kod osoba sa CF koje putuju u

endemska područja ili žive u njima (Pitt et Simpson, 2006). *B. gladioli* je fenotipski slična Bck vrstama iako im filogenetski ne pripada. U nekim sredinama, na primer SAD, značajno je zastupljena kao uzročnik respiratornih infekcija kod pacijenata sa CF (LiPuma, 2010).

**Tabela 1.** *Burkholderia cepacia* kompleks (Modifikovano iz Saiman et al., 2014)

Vrsta	Prethodna genomovar klasifikacija	Godina identifikacije i/ili denominacije
<i>B. cepacia</i>	I	1950, 1997
<i>B. multivorans</i>	II	1997
<i>B. cenocepacia</i>	III	1997, 2003
<i>B. stabilis</i>	IV	1997, 2000
<i>B. vietnamiensis</i>	V	1995, 1997
<i>B. dolosa</i>	VI	2001, 2004
<i>B. ambifaria</i>	VII	2001
<i>B. anthina</i>	VIII	2002
<i>B. pyrrocinia</i>	IX	2002
<i>B. ubonensis</i>	...	2000, 2008
<i>B. latens</i>	...	2008
<i>B. diffusa</i>	...	2008
<i>B. arboris</i>	...	2008
<i>B. seminalis</i>	...	2008
<i>B. metallica</i>	...	2008
<i>B. contaminans</i>	...	2009
<i>B. lata</i>	...	2009
<i>B. pseudomultivorans</i>	...	2013
<i>B. stagnalis</i>	...	2015 (De Smet et al., 2015)
<i>B. territorii</i>	...	2015 (De Smet et al., 2015)

### **1.3.2 Morfološke i kulturelne osobine**

Bck bakterije su tanki Gram-negativni bacili, pokretni zahvaljujući prisustvu jedne ili više flagela. Rastu dobro aerobno na hranljivom agaru, a za optimalan rast im odgovara temperatura od 25–35°C i dužina inkubacije od 48 sati. Kolonije na hranljivom agaru su neprozračne i boja se kreće od sivobebe, preko žute do crvenoljubičaste ili braon boje. Bck bakterije rastu na većini podloga koje se koriste za kultivisanje Gram-negativnih bakterija, ali sporije nego većina enteričnih Gram-negativnih bakterija i kolonije postaju uočljive tek posle dva do tri dana. Stoga je neophodno koristiti selektivne bakteriološke podloge koje sadrže kolistin. Članovi ovog kompleksa ne fermentuju glukozu, ne proizvode amonijak iz arginina, i lizin- i ornitindekarboksilaza su pozitivni. Reakcija oksidaze je spora i nema redukcije nitrata (Pitt et Simpson, 2006). Bck bakterije su fenotipski veoma slične i uglavnom ne mogu pouzdano da se razlikuju na osnovu fenotipskih osobina (Planet et Saiman, 2010).

### **1.3.3 Rasprostranjenost, ekologija i biotehnološki značaj**

Bck bakterije su široko rasprostranjene u različitim ekosistemima u prirodi. Izolovane su iz zemljišta, rizosfere biljaka, podzemnih voda, industrijske sredine, bolničke sredine i inficiranih ljudi i životinja (Vial et al., 2011; Mahenthiralingam et al., 2008).

Vrste Bck uglavnom nisu značajne kao fitopatogeni, a najveći komercijalni značaj ima njihova patogenost za crni luk kod koga izazivaju maceraciju tj. truljenje. U prirodi, većina vrsta Bck ima svojstva koja su vrlo korisna u biotehnološkom smislu jer mogu da se koriste za bioremedijaciju zemljišta, kao biološki pesticidi i za pospešivanje rasta biljaka. Ova korisna svojstva Bck su u upadljivom kontrastu sa teškim i često fatalnim infekcijama koje uzrokuju kod ljudi. Mnogi sojevi Bck se koriste kao biopesticidi za zaštitu useva od gljivičnih oboljenja čime se smanjuje upotreba hemijskih pesticida koji su škodljivi po zdravlje i sporo se razgrađuju. Bck bakterije mogu da vrše bioremedijaciju tla zahvaljujući sposobnosti da razlažu toksične materije industrijskog porekla kao što su toluen i organski rastvarači koji sadrže hlor (npr. trihloretilen) i

aromatična hlorna jedinjenja koja se nalaze u pesticidima i herbicidima (Mahenthiralingam et al., 2005).

Međutim, s obzirom na činjenicu da ovi mikroorganizmi predstavljaju potencijalnu opasnost za oboljevanje ljudi, posebno osoba sa CF, široka primena Bck bakterija kao biotehnoloških agenasa je predmet kontroverznih stavova (Chiarini et al., 2006; Holmes et al., 1998).

### **1.3.4 Širenje bakterija *B. cepacia* kompleksa**

Sve je više dokaza da neke klonalne linije Bck koje se nalaze u prirodi mogu da izazovu infekcije kod pacijenata sa CF. Na primer, *B. cepacia* soj ATCC 25416T, koji je originalno izolovan iz trulog crnog luka, izolovan je kod jednog pacijenta sa CF u Velikoj Britaniji (Govan et al., 2000). Takođe, *B. cenocepacia* PHDC (Philadelphia-District Columbia) soj, koji se često izoluje kod pacijenata sa CF u severoistočnom delu SAD, je nađen u poljoprivrednom zemljištu u ovom regionu (LiPuma et al., 2002). Filogenetska analiza *recA* gena velikog broja izolata Bck dovela je do identifikacije nekoliko klonalnih parova sojeva izolovanih iz spoljašnje sredine i kliničkih uzoraka (Payne et al., 2005). Konačno, studija koja je analizirala kliničke (n=381) i izolate iz spoljašnje sredine (n=233) iz 28 zemalja pokazala je da je 21,5% kliničkih izolata bilo identično izolatima iz spoljašnje sredine (Baldwin et al., 2007). Kako Bck bakterije ne predstavljaju deo fiziološke mikrobiote čoveka, nameće se zaključak da su Bck-pozitivni pacijenti, posebno oni koji nisu imali kontakt sa drugim pacijentima sa CF, mogli da se kolonizuju u direktnom kontaktu sa životnom okolinom (Nørskov-Lauritsen et al., 2010).

Međutim, izvestan broj Bck infekcija kod pacijenata sa CF je posledica interhumanog prenosa. Neki sojevi, posebno *B. cenocepacia*, imaju naročito izraženu sposobnost za interhumani prenos. Sojevi Bck mogu da se prenose između pacijenata sa CF kako u bolnicama, tako i izvan njih (Govan et al., 1993), kao i između pacijenata sa CF i onih koji nemaju ovo oboljenje (Holmes et al., 1999).

Hospitalizacija predstavlja poseban faktor rizika, najverovatnije zbog kontaminacije površina u bolničkoj sredini respiratornim sekretima Bck-pozitivnih

pacijenata, direktnog kontakta sa kolonizovanim pacijentima koji kašlju ili preko ruku zdravstvenih radnika. Takođe, kontaminirana respiratorna oprema kao što su nebulizatori, creva respiratora i ovlaživači ili boravak u istoj sobi sa kolonizovanim pacijentom su faktori rizika za nozokomijalni prenos. Broj mikroorganizama prisutnih u vazduhu se povećava trostruko prilikom kašljanja (Fung et al., 1998). U jednoj studiji, Bck bakterije su izolovane iz vazduha u ordinacijama u kojima su boravili Bck-pozitivni pacijenti i bile su vijabilne nakon skoro jednog sata (Humphreys et al., 1994). Ove bakterije su često kontaminanti turbina u stomatološkim ordinacijama (Pitt et Simpson, 2006).

Brojni dokazi zasnovani na visokodiskriminatorskim tehnikama genotipizacije ukazuju i na značaj socijalnih kontakata kao puta prenosa, verovatno putem inhalacije kontaminiranih kapljica aerosola. Situacije visokog rizika su plesanje, deljenje pribora za jelo, spavanje u istoj sobi i intimni kontakt (Fung et al., 1998; Govan et al., 1993; LiPuma et al., 1990). Slični dokazi dolaze i iz letnjih kampova za pacijente sa CF. Tokom letnjeg kampa 1990. godine u Ontariju, Kanada, 6% Bck-negativnih kampera je postalo kolonizovano tokom ili ubrzo nakon boravka u kampu. Svi su imali isti soj i postojao je podatak o bliskom kontaktu sa Bck-pozitivnim učesnicima (Pegues et al., 1994).

Navedeni dokazi o postojanju interhumanog prenosa Bck podržavaju politiku segregacije između Bck-pozitivnih i Bck-negativnih pacijenata, i većina CF centara je usvojila ovu praksu. Preporuke za sprečavanje širenja infekcije izazvane Bck kod pacijenata obolelih od CF objavila su udruženja za cističnu fibrozu i u Evropi i u Severnoj Americi, i nedavno su revidirane (Saiman et Siegel, 2014). Osim praktičnih saveta za kontrolu infekcija, u njima je naglašen i značaj redovnog mikrobiološkog skrininga u cilju praćenja statusa kolonizacije kod pacijenata.

Posebno ozloglašen zbog svoje visoke transmisivnosti i patogenosti je tzv. transatlantski klon, ET12 (od elektroforetski tip ili Edinburg/Toronto tip 12) koji pripada vrsti *B. cenocepacia*. Prenos ovog soja između Severne Amerike i Evrope se verovatno desio krajem 1970-ih godina tokom letnjeg kampa u Ontariju, Kanada, u kome su boravili i pacijenti iz Velike Britanije, ali je nejasno sa koje strane Atlantika je

potekao (Fung et al., 1998). Ranije se smatralo da je visok kapacitet za interhumani prenos ovog soja posledica ekspimiranja dva potencijalna markera transmisivnosti, “cable” pilusa (kodiranog *cblA* genom) i BCESM (*Burkholderia cepacia* epidemic strain marker) koji predstavlja regulator transkripcije nepoznate funkcije i kodiran je *esmR* genom. Smatralo se da je ET12 linija jedinstvena po tome što ima i *cblA* gen i BCESM. Međutim, u Velikoj Britaniji je *cblA* gen nađen i kod drugih sojeva koji takođe pripadaju *B. cenocepacia* genomovaru IIIA ali ne i ET12 liniji (Turton et al., 2009). Osim toga, epidemijsko širenje je zapaženo i kod sojeva kojima nedostaje *cblA* gen ili oba markera (De Soyza et al., 2004). Sicilijanski klon *B. cenocepacia* IIIA, koji je sličan ET12, ima i *cblA*-pozitivnu i *cblA*-negativnu varijantu i obe su udružene sa visokom transmisivnošću i visokim procentom hroničnih infekcija (Agodi et al., 2001). Takođe, *B. cenocepacia* PHDC soj, koji je bio zastupljen u epidemijama u SAD, ne poseduje nijedan od ovih markera (Chen et al., 2001). Stoga, iako se *cblA* i BCESM često smatraju potencijalnim markerima transmisivnosti, oni nisu dovoljno tačan indikator za procenu kapaciteta soja za interhumani prenos jer nisu izolovani kod svih epidemijskih sojeva, pa je verovatno da postoje dodatni faktori vezani za sam patogen ili za odgovor domaćina na prisustvo patogena koji su takođe značajni (Govan et al., 2007).

## **1.4 Laboratorijska dijagnostika respiratornih infekcija izazvanih bakterijama *B. cepacia* kompleksa kod pacijenata sa CF**

Detekcija i tačna identifikacija bakterija odgovornih za respiratorne infekcije kod bolesnika sa CF je od ključnog značaja za evaluaciju i zbrinjavanje pacijenata. Tradicionalne metode koje podrazumevaju kulturu i fenotipsku identifikaciju bakterija se i dalje koriste u rutinskim kliničkim laboratorijama, ali nisu dovoljno osetljive i specifične jer neki od uzročnika mogu da ostanu nedetektovani ili pogrešno identifikovani. Metode molekularne biologije su se u novije vreme pokazale kao korisno sredstvo za prevazilaženje problema u detekciji i identifikaciji uzročnika infekcija u ovoj grupi pacijenata (Bittar et Rolain, 2010; Burns et Rolain, 2014).

### **1.4.1 Izolacija bakterija *B. cepacia* kompleksa**

Bck bakterije nije lako izolovati u rutinskom laboratorijskom radu jer rastu sporo u poređenju sa drugim mikroorganizmima koji se uobičajeno nalaze u sputumu obolelih od CF, posebno *P. aeruginosa*. U cilju uspešnije izolacije koriste se visokoselektivne podloge koje služe i za preliminarnu identifikaciju. Princip većine selektivnih podloga zasniva se na biohemijskoj prilagodljivosti i urođenoj rezistenciji Bck bakterija na antimikrobne agense. Generalno, koriste se tri podloge: *Pseudomonas cepacia* agar (PCA) koji sadrži kristal violet, žučne soli, tikarcilin i polimiksin B, OFPBL (oksidacija/fermentacija-polimiksin-bacitracin-laktoza) agar koji sadrži polimiksin B i bacitracin, i BCSA (*B. cepacia* selektivni agar) koji sadrži polimiksin B, gentamicin i vankomicin (Miller et Gilligan, 2003).

Za optimalnu izolaciju Bck bakterija, sputum treba da bude podvrgnut likvefakciji i razblažen u sterilnom fiziološkom rastvoru ili vodi, a selektivne podloge treba da budu inkubirane na 37°C tokom 48 sati i potom na sobnoj temperaturi do ukupno pet dana. Mnogi nefermentujući Gram-negativni bacili slični pseudomonadama i druge Gram-negativne vrste rezistentne na polimiksin mogu da rastu na selektivnim podlogama za Bck, i njih treba identifikovati dodatnim testovima. Diferenciranje Bck bakterija od pseudomonada, uključujući i *Stenotrophomonas maltophilia*, nekada može biti teško i

zahteva niz biohemijskih testova i potvrdu molekularnim metodama (Pitt et Gillespie, 2006).

#### 1.4.2 Metode identifikacije bakterija *B. cepacia* kompleksa

Pošto su Bck vrste filogenetski srodne, teško ih je razlikovati na osnovu biohemijskih osobina. Automatizovani sistemi za biohemijsku identifikaciju bakterija, kao što su Vitek (BioMérieux, Francuska) i Microscan (Beckman Coulter, SAD), daju prihvatljiv nivo identifikacije ali su generalno manje pouzdani od konvencionalnih biohemijskih testova, dok je API 20NE sistem (BioMérieux, Francuska) pouzdan za identifikaciju članova kompleksa osim vrste *B. stabilis* (Pitt et Gillespie, 2006).

Tačna identifikacija vrsta Bck zahteva primenu metoda molekularne biologije, od kojih su najčešće korišćene PCR metoda za amplifikaciju 16S rDNK i PCR za amplifikaciju *recA* gena (Kiska et Riddell, 2012a; LiPuma, 2007), a u novije vreme metoda tipizacije sekvenciranjem više lokusa (engl. *multilocus sequence typing*, MLST) (Spilker et al., 2009).

Mali genetički diverzitet u okviru kompleksa ograničava primenu sekvenciranja gena za 16S rRNK u svrhu identifikacije. Međutim, varijabilnost sekvenci *recA* gena omogućuje razlikovanje do nivoa vrsta. Interesantno je da čak i u okviru pojedinih vrsta koje pripadaju Bck postoji heterogenost. Ispitivanjem polimorfizma *recA* gena, pokazano je da je *B. cenoecepacia* genetički veoma heterogena i obuhvata četiri filogenetske linije (IIIA, IIIB, IIIC i IIID), ali samo linije IIIA i IIIB imaju globalnu distribuciju među pacijentima sa CF, dok IIIC do sada nije izolovana u kontekstu ovog oboljenja (Hauser et al., 2011; Drevinek et Mahenthalingam, 2010).

Krajem 2000-ih godina razvijena je MLST metoda koja se bazira na poređenju nukleotidnih sekvenci sedam visoko konzerviranih (engl. *housekeeping*) gena koji kodiraju: beta lanac ATP sintaze (*atpD*), veliku subjedinicu glutamat sintaze (*gltB*), subjedinicu B DNK žiraze (giraze) (*gyrB*), rekombinazu A (*recA*), GTP-vezujući protein (*lepA*), acetoacil koenzim A reduktazu (*phaC*) i subjedinicu B triptofan sintaze (*trpB*) (Spilker et al., 2009). Pojedinačni sojevi se karakterišu tipom sekvence (engl. *sequence type*, ST), proizvoljnim brojem kojim se predstavlja jedinstvena kombinacija



sedam sekvenciranih alela. Zbog velike specifičnosti i diskriminatorne moći ova metoda se sve češće koristi, ali visoka cena i kompleksna metodologija ograničavaju njenu primenu u većini kliničkih mikrobioloških laboratorija.

Poslednjih godina, sve više se koristi MALDI-TOF (engl. *matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight*) masena spektrometrija kao brza, precizna i jeftina tehnika. Pokazano je da ova metoda pomaže u rutinskoj identifikaciji nefermentativnih Gram-negativnih bacila kod pacijenata sa CF (Fernández-Olmos et al., 2012). Studije pokazuju da je metoda pouzdana za identifikaciju Bck do nivoa roda, ali za sada postoje teškoće u identifikaciji do nivoa vrste. Tako, u studiji koja je poredila identifikaciju Bck vrsta MALDI-TOF tehnikom i sekvenciranjem *recA* gena, MALDI-TOF je 100% Bck izolata identifikovao do nivoa roda, ali kod 23,1% identifikacija vrste nije bila uspešna. Greške u identifikaciji su se javljale najčešće kod *B. contaminans* (100%) i *B. cepacia* (33,3%) (Fehlberg et al., 2013). Dopunjavanje baza podataka koje koristi MALDI-TOF masena spektrometrija će biti od velikog značaja za povećanje tačnosti identifikacije i u ovoj grupi mikroorganizama.

#### **1.4.3 Metode tipizacije *B. cepacia* kompleksa**

Genotipizacija i molekularno-epidemiološke studije su neophodne za razumevanje lokalne i globalne epidemiologije infekcija izazvanih Bck, identifikaciju različitih klonova Bck i analizu njihove distribucije. Opisan je veći broj metoda za tipizaciju Bck koje se razlikuju po svojoj diskriminatornoj moći i reproducibilnosti. Mnoge sada imaju samo istorijski značaj, uključujući biotipizaciju, serotipizaciju O i H antigena, ispitivanje produkcije bakteriocina ili osetljivosti na njih, analizu hromozomalne DNK, multilokusnu enzimsku elektroforezu i ribotipizaciju (Wilkinson et Pitt, 1995).

Coenye i saradnici (2002) su poredili elektroforezu na gelu u pulsirajućem polju (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE), BOX-PCR i RAPD (engl. *random amplified polymorphic DNA*) tipizaciju u pogledu kapaciteta tipizacije, reproducibilnosti i diskriminatorne moći. Ustanovili su da reproducibilnost RAPD tipizacije nije dovoljna za pouzdano poređenje između velikog broja izolata u velikim studijama, a ta relativno mala reproducibilnost ometa i poređenja između laboratorija. Sa druge strane, ova metoda je pogodna za studije manjeg obima, u kojima se ispituje manji broj izolata

prikupljenih u kraćem vremenskom periodu, kao što je slučaj pri ispitivanju bolničkih epidemija. PFGE metoda pokazuje veću reproducibilnost i diskriminatornu moć, ali predstavlja tehnički zahtevniju i skuplju alternativu. Za ispitivanja na globalnom nivou, koja obuhvataju veći broj izolata sakupljenih u dužem vremenskom periodu, BOX-PCR je ranije smatrana metodom izbora. Danas, za proučavanje lokalne epidemiologije, najčešće korišćene metode su rep-PCR i PFGE, dok se za proučavanje globalne epidemiologije Bck koristi analiza populacione strukture pomoću MLST metode (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010).

## 1.5 Epidemiologija *B. cepacia* kompleksa nekad i sad

Epidemiologija Bck i naročito značaj pojedinih vrsta u okviru Bck predstavljaju kompleksan problem (Govan et al., 2007). Iako su se sporadični opisi infekcije “*B. cepacia*” kod pacijenata sa CF pojavili kasnih 1970-ih, tek je rad Isles i saradnika iz 1984. godine skrenuo pažnju na sve učestalije izolovanje ove bakterije u respiratornim sekretima pacijenata sa CF lečenim u Toronto Children’s Hospital u Kanadi (Isles et al., 1984). Oni su zabeležili porast prevalencije “*B. cepacia*” infekcija u periodu od 1970. do 1981. godine sa 10% na 18%, što je ukazivalo na širenje epidemijskog soja. U tom periodu sličan porast učestalosti Bck infekcija je uočen i u nekim CF centrima u Severnoj Americi (Thomassen et al., 1985), Velikoj Britaniji i Irskoj (Pitt et al., 1996). Kasnije taksonomske i epidemiološke studije pokazale su da je zapravo *B. cenocepacia* bila najprevalentniji Bck patogen u većini populacija pacijenata sa CF koje su proučavane širom sveta (LiPuma et al., 2001; Mahenthiralingam et al., 2001). Jedna od najvažnijih epidemijskih linija *B. cenocepacia*, ET12, čini grupu sojeva koji su uzrokovali teške infekcije kod pacijenata u Kanadi, Velikoj Britaniji i Evropi u vreme prvih opisanih epidemija. Kao što je prethodno navedeno, smatra se da su ovaj soj preneli pacijenti sa CF nakon boravka u letnjim kampovima u Ontariju, Kanada, koji su do početka 1990-ih godina organizovani u rekreativno-edukativne svrhe. U periodu kada je učestalost kolonizacije bila na vrhuncu, početkom 1990-ih godina, pronađen je kod skoro trećine kolonizovanih pacijenata u Velikoj Britaniji i Irskoj (Pitt et al., 1996).

Soj ET12 i nekoliko drugih epidemijskih sojeva dominantnih u Kanadi (poznati kao random amplified polymorphic DNA ili RAPD tipovi 01, 04 i 06) (Speert et al., 2002) i u Evropi, kao češki epidemijski klon CZ1 (Drevinek et al., 2005) i sicilijanski epidemijski klon (Agodi et al., 2001) pripadaju *B. cenocepacia* IIIA podgrupi. Nasuprot tome, dominantni *B. cenocepacia* epidemijski klonovi u SAD spadaju u podgrupu IIIB i uključuju Midwest klon (Coenye et LiPuma, 2002) i PHDC soj (Chen et al., 2001), koji je takođe pronađen i kod pacijenata sa CF u Evropi (Coenye et al., 2004).

Danas, prevalencija Bck bakterija u populaciji pacijenata sa CF se razlikuje u različitim zemljama, ali je generalno niska i kreće se u rasponu od 1,4 % do oko 6 % u Severnoj Americi i većini zapadnoevropskih zemalja (CFF, 2014; CFC, 2015; Zolin et

al., 2014). Većinu čine adultni pacijenti. Segregacija Bck-pozitivnih od Bck-negativnih pacijenata sa CF sada je uobičajena praksa što, u kombinaciji sa primenom drugih efikasnih mera kontrole širenja infekcija, doprinosi da broj novih kolonizovanih pacijenata bude manji (Govan et al., 2007).

Dve vrste, *B. cenocepacia* i *B. multivorans*, su globalno najzastupljenije i sreću se u >85% Bck infekcija (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010). Do početka 2000-ih godina, dominantno je izolovana *B. cenocepacia*. Od 2002. godine, zapaženo je da se epidemiologija infekcija izazvanih Bck menja i da najveći broj novih infekcija izaziva *B. multivorans*, a uglavnom se radi o nesrodnim klonovima što ukazuje da do kolonizacije verovatnije dolazi iz spoljašnje sredine nego interhumanim prenosom (Foweraker, 2009; Nørskov-Lauritsen et al., 2010). Visok udeo *B. cenocepacia* se i dalje održava u nekim populacijama pacijenata, na primer u Češkoj i Italiji (Drevinek et al., 2005; Golini et al., 2006). Međutim, u drugim zemljama, uključujući Kanadu, Veliku Britaniju, SAD, Francusku, Portugal, Belgiju, Novi Zeland i Australiju, zabeležen je porast proporcije *B. multivorans*, dok je *B. cenocepacia* na drugom mestu po učestalosti (Baldwin et al., 2008; Govan et al., 2007).

Prevalencija ostalih 18 vrsta Bck u poređenju sa *B. cenocepacia* i *B. multivorans* je manja ali varira u zavisnosti od zemlje. U SAD pored dve pomenute vrste zastupljene su i *B. cepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* i *B. dolosa* (zajedno odgovorne za oko 16% infekcija) (Reik et al., 2005). U Portugalu su dominantne *B. cepacia* (36,4%) i *B. stabilis* (18,2%) (Cunha et al., 2003). U Brazilu je značajno zastupljena *B. vietnamiensis* (15,2%), odmah iza *B. cenocepacia* (Carvalho et al., 2007). *B. contaminans* je tokom poslednjih godina dominantan izolat u Argentini (58%) (Martina et al., 2013) i Španiji (36,5%) (Medina-Pascual et al., 2015).

Ova pojava je verovatno posledica kombinacije više faktora kao što su: (1) primena strogih mera kontrole infekcija čime je sprečeno širenje epidemijskih sojeva koji pripadaju uglavnom *B. cenocepacia* ali te mere su neefikasne protiv kolonizacije drugim Bck vrstama koje žive u prirodnoj sredini i (2) visoki mortalitet u grupi pacijenata inficiranih *B. cenocepacia* zbog čega se njihov broj smanjio (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010).

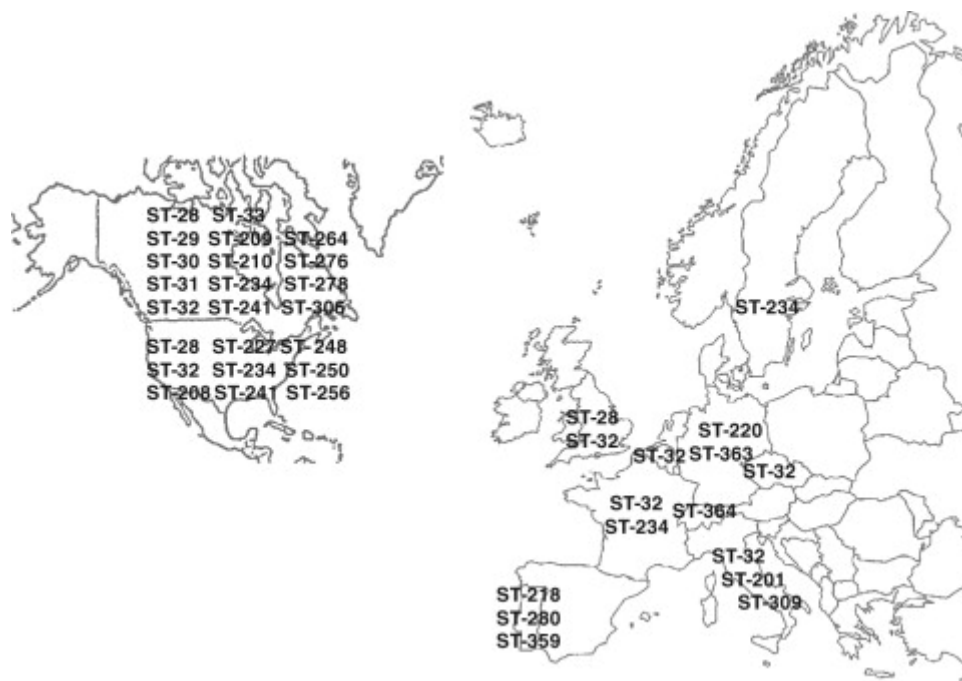
*B. cenocepacia* se generalno smatra virulentnijom od ostalih vrsta jer češće dovodi do pada plućne funkcije i udružena je sa većim mortalitetom posle transplantacije pluća (Planet et Saiman, 2010). Na primer, u CF centru za lečenje odraslih pacijenata u Mančesteru, Velika Britanija, uočeno je da je petogodišnje preživljavanje pacijenata nakon kolonizacije *B. cenocepacia* iznosilo 66,6%, što je značajno niže u poređenju sa grupom pacijenata inficiranih *P. aeruginosa* (85,3%) (Jones et al., 2004). Ipak, tako nisko preživljavanje nije slučaj u svim populacijama CF pacijenata gde je zastupljenost *B. cenocepacia* velika. Podaci iz CF centra za odrasle u Pragu, Češka, ukazuju da je 91,4% *B. cenocepacia*-pozitivnih pacijenata preživljavalo petogodišnji period. Nije poznato zašto se stopa mortaliteta razlikuje među populacijama pacijenata inficiranih Bck bakterijama; svakako je moguće spekulirati da su razlike među *B. cenocepacia* sojevima odgovorne za različiti klinički tok u ova dva CF centra. Sojevi ET12 linije su bili odgovorni za epidemiju *B. cenocepacia* u Mančesteru (Jones et al., 2004), dok su u Pragu pacijenti bili inficirani sojem CZ1 (Drevinek et al., 2005). Iako su ova dva soja veoma blisko srodna jer pripadaju podgrupi *B. cenocepacia* IIIA, razlike u stopama preživljavanja ukazuju da oni imaju različitu virulenciju tokom infekcije.

### **1.5.1 Doprinos metode tipizacije sekvenciranjem više lokusa (MLST) ispitivanju epidemiologije *B. cepacia* kompleksa**

Primena MLST metode je pružila novi uvid u globalnu epidemiologiju *B. cenocepacia* jer je dovela do revizije stepena genetičke srodnosti između i u okviru pojedinačnih epidemijskih linija. Iako neki klonovi prethodno definisani drugim metodama tipizacije pripadaju istom ST-u (npr. svi RAPD grupa 06 izolati originalno opisani u Kanadi su ST210), za druge epidemijske klonove *B. cenocepacia* se ispostavilo da obuhvataju nekoliko različitih ST-ova. Značajno otkriće je da izolati ET12 linije spadaju u najmanje pet različitih ST-ova, a samo ST28 predstavlja klon ET12 koji je odgovoran za interkontinentalno širenje između Kanade i Velike Britanije.

Uprkos pomenutim promenama u epidemiologiji Bck vrsta, jasno je da *B. cenocepacia* ostaje jedan od dominantnih i problematičnih CF patogena iz globalne perspektive. Praćenje globalne distribucije Bck sojeva MLST metodom je otkrilo da su, osim *B. cenocepacia* sojeva iz ET12 linije, i neki drugi epidemijski sojevi široko

diseminirani. Tako, kanadski epidemijski soj RAPD 01 i češki epidemijski soj CZ1 zapravo pripadaju ST32, a on je nađen i u drugim zemljama širom sveta (Slika 3).



**Slika 3.** Globalna distribucija *Burkholderia cenocepacia* IIIA sojeva koji su analizirani metodom tipizacije sekvenciranjem više lokusa (MLST) i deponovani u javnoj MLST bazi podataka (Preuzeto iz Drevinek, 2010)

### 1.5.2 Epidemiološka situacija u Srbiji

O epidemiološkoj situaciji vezanoj za kolonizaciju i infekciju Bck bakterijama kod pacijenata sa CF u istočnoevropskim zemljama i regionu Balkana uglavnom nema dostupnih podataka.

Tačna incidencija oboljevanja od CF u Srbiji nije poznata jer univerzalni neonatalni skrining program za ovu bolest još uvek nije implementiran (Radivojevic et al., 2013). Smatra se da trenutno u našoj zemlji živi oko 200 osoba sa CF, a oko 90% pacijenata se prati u Centru za cističnu fibrozu koji se nalazi pri Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić” u Beogradu, pedijatrijskoj ustanovi tercijarnog nivoa zdravstvene zaštite. Ovaj Centar pruža ambulantnu i stacionarnu multidisciplinarnu zdravstvenu zaštitu pacijentima sa CF svih uzrasta, a jednu trećinu čine osobe uzrasta 18

i više godina. Većina pacijenata živi u Srbiji (83,2%), a ostali dolaze iz Crne Gore i Bosne i Hercegovine jer je Centar istovremeno i regionalni referentni centar za CF.

Nema dostupnih podataka o prevalenciji Bck kolonizacije kod pacijenata sa CF u našoj zemlji, niti o fenotipskim i genotipskim karakteristikama izolata.

U Laboratoriji za kliničku mikrobiologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić”, skrining na prisustvo Bck u uzorcima iz respiratornog trakta metodom kultivisanja je započet 2005. godine, a tada su identifikovani i prvi kolonizovani pacijenti, ukupno troje. Retrogradnom analizom ustanovljeno je da je tokom perioda 2005.–2006. prevalencija bila relativno niska, oko 3%, ali se godišnje udvostručavala tokom naredne tri godine i dostigla 21,5% u 2009. godini. Godišnja incidencija je bila 4,5%, 8,4% i 13,1% tokom 2007., 2008. i 2009. godine, tim redosledom. Međutim, ovi izolati nisu rutinski identifikovani do nivoa vrsta Bck i karakterisani metodama molekularne biologije.

## 1.6 Virulencija i patogenetski potencijal *B. cepacia* kompleksa

U poređenju sa napretkom postignutim u taksonomiji i molekularnoj epidemiologiji, saznanja o molekularnim mehanizmima patogenosti i virulencije Bck su još uvek ograničena. Osnovna pitanja su zašto Bck kolonizuje skoro isključivo respiratorni trakt pacijenata sa CF i zašto je kod određenih pacijenata Bck agresivni patogen koji uzrokuje tešku ili fatalnu bolest a kod drugih ima benigni klinički tok (Leitão et al., 2010). Poznavanje ovih mehanizama je važno za dizajniranje novih pristupa u lečenju koji će najverovatnije biti usmereni i na neke od faktora virulencije (Sousa et al., 2011). S obzirom na činjenicu da *B. cenocepacia* predstavlja jedan od najintringantnijih patogena u okviru Bck jer je često udružena sa smanjenim preživljavanjem i obuhvata većinu do sada opisanih epidemijskih sojeva, istraživanja o patogenosti i virulenciji Bck bakterija uglavnom su bila usmerena na ovu vrstu (Drevinek et Mahenthalingam, 2010).

Identifikovano je nekoliko faktora virulencije, međutim, nisu svi prisutni kod svih sojeva Bck, niti je za sve faktore dokazano da značajno doprinose nastanku bolesti kod ljudi (Govan, 2003). Ove razlike mogu da budu posledica različitih eksperimentalnih pristupa u ispitivanju mehanizama patogenosti, ali i razlika među sojevima (Loutet et Valvano, 2010). Takođe, one ukazuju i da ishod infekcije Bck bakterijama ne zavisi samo od prisustva faktora virulencije već i od interakcija između domaćina i uzročnika, a verovatno i interakcija između različitih vrsta patogena u plućima (Govan et al., 2007). Sve brojniji dokazi ukazuju da je virulencija Bck poligenska, i uključuje gene odgovorne za preživljavanje u uslovima stresa. Bck genom sadrži gene koji su ključni za kolonizaciju i započinjanje hronične infekcije respiratornog trakta, a odgovarajući efektori su uključeni u motilitet, adheziju i oštećenje tkiva domaćina (Sousa et al., 2011). Njihova fizička pozicija i transkriptomске jedinice su mapirane u genomu soja *B. cenocepacia* J2315 koji je predstavnik klona ET12 (Drevinek et Mahenthalingam, 2010). Potencijalni faktori virulencije *B. cenocepacia* uključuju “cable” pile i različite adhezine, flagele, sekretorne sisteme tipa III i VI, lipopolisaharid, siderofore koje heliraju gvožđe, quorum-sensing sisteme, produkciju ekstracelularnih proteina kao što su proteaze, lipaze i hemolizini, i druge (Tegos et al., 2012; Mohr et Tomich, 2001).



### 1.6.1 Organizacija genoma bakterija *B. cepacia* kompleksa

*Burkholderia* spp. imaju jedan od najvećih i najkompleksnijih do sada opisanih bakterijskih genoma čija je važna karakteristika multireplikonska struktura. Genom je organizovan u tri cirkularna hromozomalna replikona i jedan do pet megaplazmida, veličine od 6,2 do 8,7 Mbp, sa visokim sadržajem GC baza (Sousa et al., 2011). Genom sadrži i brojne duplikacije gena, insercione sekvence (IS) i mobilne elemente. Smatra se da zavidna veličina i podeljenost genoma Bck povećavaju fleksibilnost da se stiču i gube geni što doprinosi sposobnosti ovih mikroorganizama da koriste veliki broj metaboličkih puteva. Genomi Bck mogu brzo da mutiraju kada su ove bakterije podvrgnute uslovima stresa *in vitro* ili tokom infekcija (Loutet et Valvano, 2010).

### 1.6.2 Genomska ostrva i mobilni elementi

Sekvenciranje prvog Bck genoma, koji je pripadao soju *B. cenocepacia* J2315 iz ET12 linije, završeno je 2009. godine (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010). Identifikovano je 14 genomskih ostrva, najverovatnije stečenih horizontalnim transferom gena, što izgleda da igra ključnu ulogu u evoluciji ove epidemijske linije zbog uvođenja novih funkcija koje olakšavaju opstanak i patogenezu u CF plućima. Na primer, to je slučaj sa genomskim ostrvom 11, ranije zvanim *cci* ostrvo patogenosti, za koje se čini da se isključivo sreće kod sojeva *B. cenocepacia*. Ovo ostrvo patogenosti sadrži i gene virulencije i gene odgovorne za metaboličke funkcije, uključujući CciIR quorum-sensing sistem, operon koji učestvuje u biosintezi masnih kiselina, regulatore transkripcije i gene uključene u metabolizam aminokiselina. Na genomskom ostrvu 11 se nalazi i gen *esmR* koji kodira BCESM, protein regulator transkripcije koji je karakterističan za soj *B. cenocepacia* ET12, i za koji se smatralo da doprinosi transmisivnosti i virulenciji (Baldwin et al., 2004). Kasnije studije su otkrile da se ovaj marker sreće isključivo kod *B. cenocepacia* ali nije indikativan za sposobnost soja da uzrokuje infekciju ili da se prenosi između pacijenata. Kod kanadskih pacijenata sa CF, više od 80% svih sojeva *B. cenocepacia* ima BCESM, ali u SAD je samo 23% sojeva *B. cenocepacia* pozitivno. Uprkos ovim razlikama u prevalenciji, pokazano je da su sojevi koji imaju BCESM veoma problematični, mogu da zamene *B. multivorans* kod

pojedinih pacijenata, imaju sposobnost za interhumani prenos i mogu da budu povezani sa većim mortalitetom kod pacijenata sa CF (Mahenthiralingam et al., 2005).

Sekvencirani su i genomi nekoliko drugih sojeva Bck (Loutet et Valvano, 2010). U do sada sekvenciranim genomima Bck, procenat gena koji kodiraju proteine nepoznate funkcije kreće se od 13 do 35%. Sasvim je moguće da bi značajan broj ovih gena mogao da bude uključen, direktno ili indirektno, u patogenezu infekcija izazvanih Bck (Sousa et al., 2011).

### 1.6.3 Adaptivni odgovor

Razvoj hronične plućne infekcije izazvane *B. cenocepacia* zahteva uspešnu kolonizaciju i dugoročno preživljavanje, što podrazumeva adaptaciju kako bi se mikroorganizam izborio sa stresom koji izaziva selektivni pritisak različitih stresora u plućima obolelih od CF. U njih spadaju imunski mehanizmi odbrane domaćina, antimikrobna terapija, nedovoljna raspoloživost nutrijenata i ograničena količina kiseonika (Tegos et al., 2012). Mira i saradnici (2011) su poredili nivoe ekspresije gena kod dve klonalne varijante *B. cenocepacia* izolovane tokom dugotrajne kolonizacije pacijenta sa CF koji je umro od “cepacia sindroma”. Analizirani su prvi *B. cenocepacia* izolat dobijen kod tog pacijenta i izolat dobijen tri godine kasnije, koji je bio rezistentniji na više klasa antibiotika. Nađeno je da je došlo do značajnog koordinisanog reprogramiranja ekspresije preko 1000 gena vezanih za rezistenciju na antibiotike, oksidativni stres, metabolizam gvožđa, pokretljivost. Ovo transkripciono reprogramiranje odlikava događaje koji se javljaju tokom dugotrajne kolonizacije, antibiotske terapije i progresije bolesti. Povećanu ekspresiju su imali geni koji kodiraju faktore uključene u translaciju, biosintezu siderofore ornibaktina, efluks lekova i adheziju za epitelne ćelije pluća i mucin. Promena ekspresije ostalih gena ukazala je na adaptaciju na uslove ograničene količine nutrijenata i kiseonika u CF plućima.

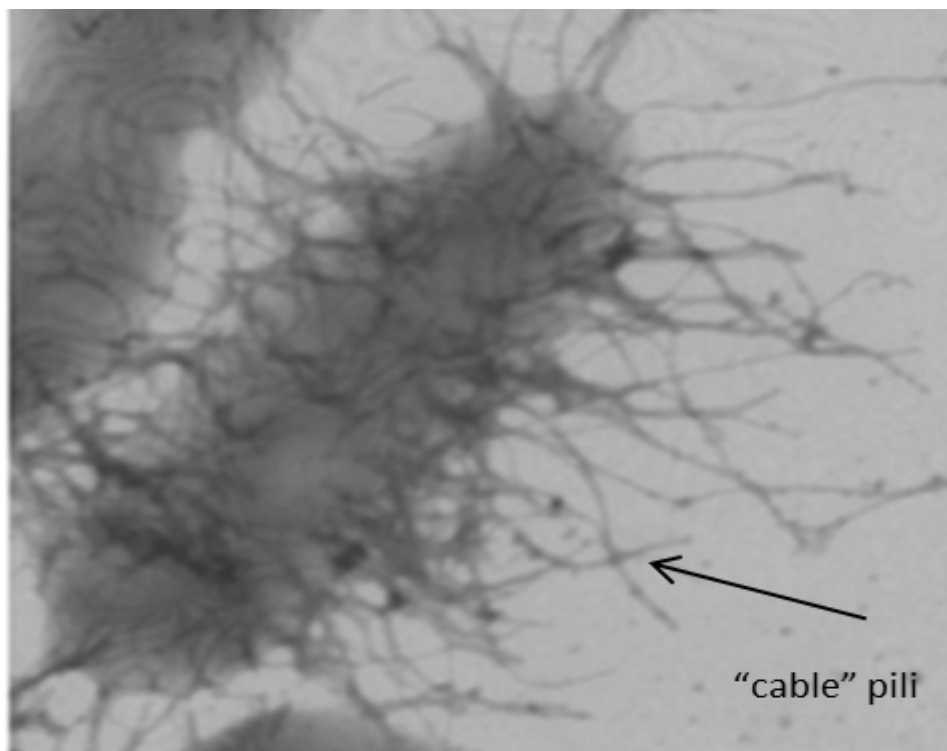
Pored toga, kao odgovor na štetne efekte oksidativnog stresa koji nastaje usled delovanja reaktivnih kiseoničnih radikala produkovanih od strane fagocitnih ćelija, *B. cenocepacia* može da koristi nekoliko antioksidativnih enzima, uključujući superoksid-dismutaze (citoplazmatsku SodB i periplazmatsku SodC), katalaze, katalaza-

peroksidaze (katA i katB) i alkil-hidroperoksidazu (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010).

#### 1.6.4 Pokretljivost i faktori adhezivnosti

Adherencija Bck za ćelije i mukozne površine je prvi korak u interakciji sa ćelijom domaćina i preduslov za uspostavljanje produktivne infekcije. *B. cenocepacia* adherira za epitelne ćelije preko proteinskih i glikolipidnih receptora, pored vezivanja za sekretorne mucine (McClellan et Callaghan, 2009).

Pili pojačavaju adheziju bakterija za epitel i mucin i olakšavaju početne korake kolonizacije i infekcije. Elektronskom mikroskopijom identifikovano je pet tipova pila (Goldstein et al., 1995). Sojevi *B. cenocepacia* ET12 linije eksprimiraju tzv. “cable” pile koji su dobili ime zbog karakteristične morfologije nalik na upleteno užje i izuzetno velike dužine od 2–4  $\mu\text{m}$  (Slika 4) (Tomich et Mohr, 2004). Ranije se smatralo da je prisustvo pila koje kodira gen *cblA* ekskluzivno vezano za ET12 soj, ali je ovaj gen pronađen kod još nekih epidemijskih sojeva, npr. u Italiji (Agodi et al., 2001). “Cable” pili se, udruženi sa adhezinom AdhA (proteinom od 22 kDa), vezuju za proteinski receptor citokeratin 13 (CK13) koji se nalazi na epitelnim ćelijama. Interakcija CK13/AdhA nije tako jasna kao što se ranije smatralo jer je ustanovljeno da su se i sojevi *B. cenocepacia* koji nisu imali “cable” pile vezivali za CK13. AdhA je distribuiran po celoj površini fimbrija, posreduje u vezivanju za mucin i ima esencijalnu ulogu u invaziji respiratornog epitela (Sajjan et Forstner, 1992). Druga klasa receptora na epitelnim ćelijama su glikolipidni receptori, a na afinitet za ove receptore utiče prisustvo ili odsustvo “cable” pila. Pored toga, ovi glikolipidi mogu da utiču na intracelularne signalne puteve, podstičući inflamatorni odgovor (McClellan et Callaghan, 2009).



**Slika 4.** Prikaz morfologije "cable" pila (Modifikovano iz Tomich et Mohr, 2004)

Flagele su važni faktori virulencije koji ne samo da omogućavaju pokretljivost, već služe kao adhezini i doprinose sposobnosti Bck bakterija da prodiru u ćelije domaćina. Nepokretni mutanti soja J2315 nisu mogli da vrše invaziju epitelnih ćelija, ali je sposobnost adhezije ostala očuvana. Povećana transkripciona aktivnost flagelarnih gena je detektovana kada je *B. cenocepacia* inkubirana u sputumu pacijenata sa CF. Ovo zapažanje je u suprotnosti sa analizom transkripcionog profila *P. aeruginosa*, koji postaje nepokretan tokom hronične infekcije u CF plućima. Zadržana pokretljivost *B. cenocepacia* može da bude odgovorna za njenu sposobnost da invadira ćelije domaćina i uzrokuje sepsu (Drevinek et Mahethiralingam, 2010). Bakterijski flagelin je jedini poznati ligand koji prepoznaje receptor sličan Tollu, TLR5. Flagelin *B. cenocepacia* započinje signalnu kaskadu kroz interakciju sa TLR5, što za rezultat ima sekreciju IL-8 i pojačan inflamatorni odgovor koji dovodi do većeg oštećenja pluća (Mahenthiralingam et al., 2005).

### 1.6.5 Faktori invazivnosti i intracelularno preživljavanje

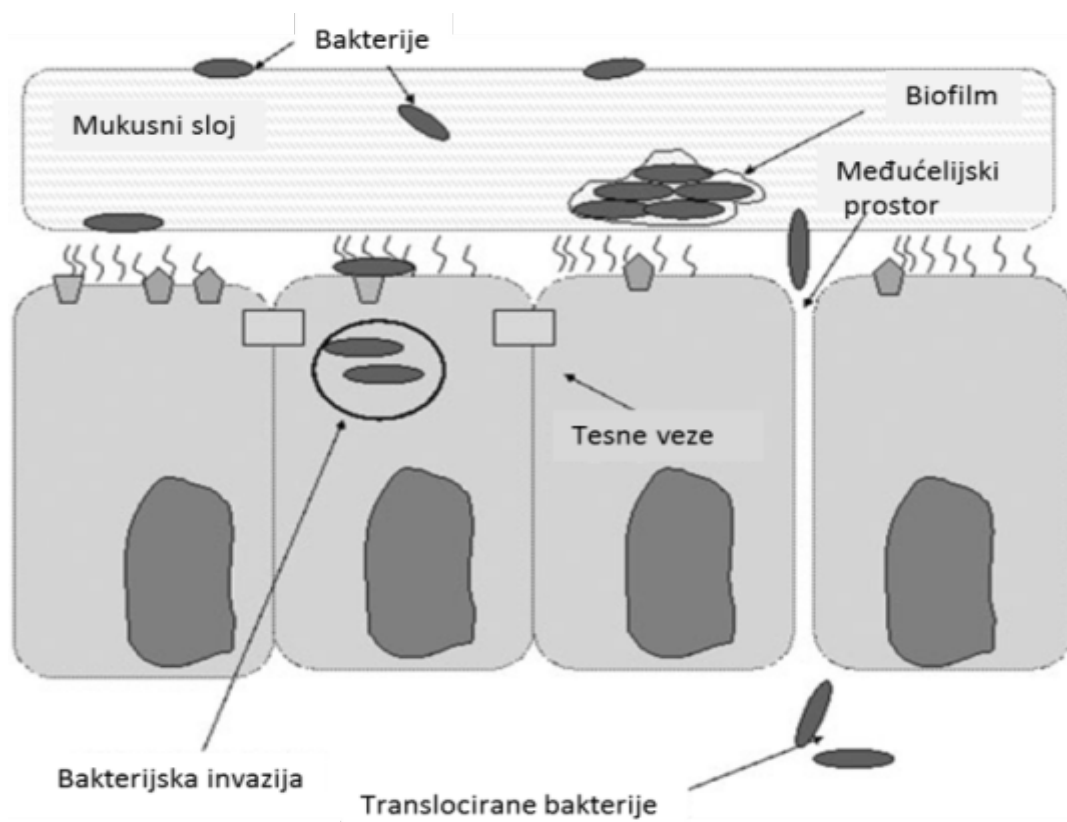
Adherencija *B. cenocepacia* za mukozne i ćelijske površine može da doprinosi bakterijskoj perzistenciji u plućima obolelih od CF, dok penetracija u epitelne ćelije i preživljavanje u njima omogućuje i sistemsko širenje bakterije u dublja tkiva. Intracelularno preživljavanje obezbeđuje zaštićenu nišu i omogućuje perzistenciju *B. cenocepacia* uprkos snažnom imunskom odgovoru, u isto vreme umanjujući efekat antimikrobne terapije (McClellan et Callaghan, 2009). Moura et al. (2008) su utvrdili da sve vrste Bck pokazuju sličnu sposobost da indukuju ekspresiju medijatora imunskog odgovora domaćina dok se razlikuju prema sposobnosti da adherišu, invadiraju i ubiju ćelije respiratornog epitela.

Intracelularna invazija je posredovana vakuolama nastalim od ćelijske membrane nakon inicijalnog ređanja bakterija duž epitelne membrane. Međutim, uočeno je da različite Bck vrste mogu da imaju različite načine invazije u kulturama ćelija respiratornog epitela, uključujući invaziju u obliku biofilma, rearanžman citoskeleta i posledičnu destrukciju ćelije, i penetraciju kroz epitel putem paracitoze. Bck bakterije razaraju međućelijske tesne veze (engl. *tight junctions*) i dolazi do translokacije od apikalne strane do bazolateralne strane intaktnog jednoslojnog epitela *in vitro* (Slika 5). Kod jednog broja pacijenata dolazi do bakterijemije usled prodora Bck bakterija kroz respiratorni epitel i ulaska u krvotok. Izolati četiri različite vrste u okviru Bck su pokazali slične stepene translokacije, što navodi na zaključak da potencijal za uzrokovanje septikemije nije ograničen samo na dve najvirulentnije vrste, *B. cenocepacia* i *B. multivorans* (McClellan et Callaghan, 2009).

Uz pomoć imunohistoloških tehnika, Sajjan i saradnici (2001) su posmatrali ponašanje *B. cenocepacia* u plućima pacijenata sa CF obolelih od "cepacia" sindroma, gde su bakterijske ćelije uočene u eksudatu u bronhijalnom lumenu i između ćelija respiratornog epitela. Bakterijske ćelije su bile difuzno raspoređene kod pacijenata sa hroničnom infekcijom, ali kod akutnih infekcija distribucija je bila više fokalnog tipa, sa bakterijskim ćelijama smeštenim na oštećenim epitelnim površinama i u apscesima. Sa napredovanjem od hronične kolonizacije ka invazivnoj infekciji, *B. cenocepacia* migrira kroz epitelnu barijeru i vrši invaziju plućnog parenhima i kapilara, sa posledičnim

nastankom septikemije. Na Slici 5 dat je šematski prikaz interakcija Bck bakterija sa epitelnim ćelijama respiratornog trakta.

Bck bakterije mogu da penetriraju i ćelije *Acanthamoeba*, preživljavaju i razmnožavaju se u njima. Ovo ukazuje na odnos simbioze između ovih bakterija i slobodnoživećih ameba, koje mogu da služe kao rezervoar za ovu bakteriju i, čak, budu odgovorne za prenos Bck bakterija na pacijente obolele od CF (Landers et al., 2000; Marolda et al., 1999).



**Slika 5.** Shematski prikaz interakcije Bck bakterija sa epitelnim ćelijama pluća. Bakterije se vezuju za receptore na epitelnim ćelijama pluća a zatim vrše invaziju ili putem intracelularnih vakuola, ili translokacijom kroz epitel. Bck bakterije takođe formiraju biofilm koji stupa u interakciju sa epitelnim ćelijama (Prilagođeno iz McClean et Callaghan, 2009).

### 1.6.6 Quorum sensing

Quorum sensing je oblik međucelijske komunikacije bakterija kojom se reguliše ekspresija brojnih gena, uključujući gene virulencije, i funkcioniše putem dve glavne komponente, N-acil-homoserin lakton (AHL) sintaze i regulatora koji je responsivan na AHL (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010). Regulacija AHL je zavisna od gustine ćelijske populacije i aktivira se tek kad ona dostigne kritičnu gustinu. Na taj način, quorum sensing pruža mehanizam kojim bakterije mogu brzo da se adaptiraju na promenu uslova sredine i pokazano je da je on ključan za mnoge interakcije vezane za virulenciju. Čitav niz gena je regulisan quorum-sensing sistemom, uključujući gene za sintezu siderofora, produkciju proteaza, sekretorni sistem tipa III (engl. *type III secretion system*, T3SS), pokretljivost i formiranje biofilma (Mahenthiralingam et al., 2005). Postoje mišljenja da ovaj vid regulacije ekspresije gena obezbeđuje da bakterija ostane “nevidljiva” za imunski sistem domaćina dok ne dostigne dovoljnu gustinu da savlada imunsku odbranu i uspostavi infekciju (Eberl, 2006).

*B. cenocepacia* uvek poseduje CepI sintazu sa CepR regulatorom, a homologni sistemi postoje i kod ostalih Bck vrsta. CepIR sistem *B. cenocepacia* ima ključnu ulogu za punu virulenciju što je dokazano na životinjskim modelima infekcija (Sokol et al., 2003). Sojevi *B. cenocepacia* koji imaju genomsko ostrvo 11 kodiraju dodatne quorum-sensing komponente (na primer, CciI sintazu i CciR regulator). Zanimljivo je da je otkriven i treći regulator (nazvan CepR2) iako nije utvrđeno da je povezan sa nekom AHL sintazom (Loutet et Valvano, 2010). Ekspresija većine gena koji su kontrolisani quorum-sensing sistemom je regulisana pomoću CepR, i on funkcioniše prvenstveno kao pozitivni regulator aktivacije gena, dok je CciR inhibitor ekspresije gena. Postoji interakcija između CepIR i CciIR sistema, i otkriveno je da je oko 200 gena regulisano pomoću oba postojeća quorum-sensing sistema, ali u recipročnom smislu (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010).

Zanimljivo je da Bck bakterije mogu da prepoznaju i odgovore na quorum-sensing molekule *P. aeruginosa*, ukazujući na moguću komunikaciju među različitim bakterijskim vrstama u plućima obolelih od CF (Leitão et al., 2010).

### 1.6.7 Načini preuzimanja gvožđa

Sposobnost Bck bakterija da apsorbuju gvožđe igra ulogu u početnim fazama kolonizacije a doprinosi i težini plućne infekcije. U uslovima nedostatka gvožđa koji vladaju u sputumu bolesnika sa CF, *B. cenocepacia* produkuje dve glavne siderofore, ornibaktin i piohelin, koje vezuju slobodno gvožđe iz okoline. Ornibaktin je biološki važniji, i on može da kompenzuje nedovoljnu funkciju piohelina (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010). Produkcija piohelina može da bude nedovoljna kod izvesnih sojeva kao što je *B. cenocepacia* J2315, koji sadrži "frameshift" mutaciju u *pchF*, jednom od gena neophodnih za sintezu piohelina. Međutim, kada je soj J2315 inkubiran u hranljivom medijumu koji je sadržao sputum pacijenta sa CF koji je deficitaran u gvožđu, nekoliko gena za sintezu piohelina (*pchR* i *pchD*) je bilo pojačano ekspimirano, ali ne i geni za ornibaktin, što ukazuje da i put sinteze piohelina može da bude aktivan kod J2315 (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010).

Produkcija siderofora doprinosi patogenezi Bck infekcija. Pored uloge u apsorpciji gvožđa, piohelin ima ulogu u oštećenju tkiva. Gvožđe vezano za piohelin je efikasan katalizator pri stvaranju hidroksil-radikala i doprinosi oštećenju pulmonalne arterije, endotelnih ćelija i epitelnih ćelija pluća usled izloženosti superoksidu i vodonik-peroksidu (Leitão et al., 2010).

### 1.6.8 Površinski polisaharidi

Jedna od glavnih komponenti spoljašnje površine ćelija Bck bakterija je lipopolisaharid (LPS). On ima izražen endotoksični kapacitet i sposobnost da indukuje produkciju citokina, što dovodi do neželjenih efekata kod domaćina. Struktura LPS kod Bck se razlikuje od LPS drugih Gram-negativnih bakterija. On sadrži manje fosfata, i sadrži neuobičajeni šećer D-glicero- $\alpha$ -D-talo-okt-2-ulopiranosiloničnu kiselinu, a 4-amino-4-dezoksiarabinozne rezidue su vezane za fosfate lipida A. Ove modifikacije snižavaju anjonski napon površine Bck ćelije, inhibirajući vezivanje i posledične efekte katjonskih antimikrobnih peptida i polimiksina (Mahenthiralingam et al., 2005). LPS iz soja J2315 stimuliše ushodnu regulaciju proinflamatornih citokina IL-6 i IL-8 iz krvi. Takođe, on povećava površinsku ekspresiju receptora za komplement tip 3 (CR3) na površini neutrofila i pospešuje respiratorni prasak u neutrofilima. Ekspresija receptora



CR3 ima ulogu u nizu neutrofilnih funkcija uključujući adheziju, fagocitozu, aktivaciju i transmigraciju. Smatra se da LPS-om uzrokovana hemotaksa neutrofila i pojačan respiratorni prasak doprinose povećanom inflamatornom oštećenju, što doprinosi širenju Bck bakterija izvan pluća (Vinion-Dubiel et Goldberg, 2003).

Bck bakterije proizvode najmanje četiri različita egzopolisaharida (EPS), a najzastupljeniji je cepacian, polimer karakterističan za ovaj bakterijski kompleks (Chiarini et al., 2004). Iako je produkcija EPS kod Bck bakterija ranije smatrana retkom pojavom (Govan et Deretic, 1996), Zlosnik i saradnici (2008) su pokazali da su sve Bck vrste sposobne da eksprimiraju mukoidni fenotip usled produkcije EPS. Ipak, sojevi *B. cenocepacia*, najvirulentnije vrste u okviru kompleksa, uglavnom su bili nemukoidni. Pored toga, fenotipska konverzija iz mukoidne u nemukoidnu formu je češće bila udružena sa pogoršanjem bolesti, dok je mukoidni fenotip bio udružen sa perzistencijom u plućima. Iako nije neophodan za započinjanje stvaranja biofilma, cepacian je potreban za stvaranje obilnog biofilma i njegovo sazrevanje (Sousa et al., 2011). Cepacian ometa fagocitozu bakterija od strane neutrofila, inhibira hemotaksu neutrofila i produkciju reaktivnih kiseoničnih molekula. Neophodan je i za preživljavanje u uslovima dehidratacije i za rezistenciju na toksične jone metala (Leitão et al., 2010). Čini se da EPS povećava virulenciju izolata koji ga proizvode, ali i sojevi koji ga ne proizvode mogu da uzrokuju teške infekcije (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010).

### **1.6.9 Ostali faktori virulencije**

Ostali klasični faktori virulencije koji su opisani kod *B. cenocepacia* uključuju egzoprodukte kao što su ekstracelularna lipaza, metaloproteaze (ZmpA i ZmpB) i serin proteaze. Smatra se da su njihove funkcije direktno vezane za interakciju sa epitelnim ćelijama. Dok metaloproteaze i serin proteaze izgleda da imaju ulogu u proteolizi ekstracelularnog matriksa i proizvode ih mnoge, ali ne sve, Bck vrste, smatra se da lipaze učestvuju u invaziji i njihova produkcija je široko rasprostranjena među članovima Bck (McClellan et Callaghan, 2009). Sekretacija proteina je mehanizam kojim bakterije dopremaju proteine bitne za virulenciju i preživljavanje u spoljašnju sredinu i ćelije domaćina, čime utiču na odgovor domaćina. Više transportnih sistema je

uključeno u sekreciju nekih faktora virulencije kod Bck sojeva (proteaza, hemolizina i adhezina) (Leitão et al., 2010).

#### **1.6.10 Biofilm**

Još jedna značajna osobina Bck bakterija je njihova sposobnost da produkuju biofilm, zajednice u kojima bakterije žive sesilnim načinom života, zaštićene od faktora spoljašnje sredine i agresivnog dejstva antibiotika i medijatora imunskih mehanizama odbrane (Mahenthiralingam et al., 2005). Produkcija biofilma *in vitro* je zajednička osobina Bck bakterija, bez obzira na vrstu, i udružena je sa produkcijom AHL molekula koji su odgovorni za međućelijsku komunikaciju i učestvuju u sintezi biofilma. Bck bakterije koje žive u biofilmu su rezistentnije na antibiotike nego planktonske ćelije, što doprinosi njihovoj perzistenciji u plućima obolelih od CF (Caraher et al. 2007). Dales i saradnici (2009) su pokazali da su biofilmovi koje stvaraju Bck bakterije bili rezistentniji na antibiotike u poređenju sa biofilmovima *P. aeruginosa*.

U patogenetskom smislu, formiranje biofilma može da bude značajno u uspostavljanju i održavanju infekcije, dok sposobnost penetriranja i razmnožavanja unutar epitelnih ćelija i makrofaga može da posreduje u oštećenju tkiva i nastanku bakterijemije. Zajedno, stvaranje biofilma i intracelularna lokalizacija pojačavaju bakterijsku rezistenciju na antibiotike, favorizujući produženo preživljavanje Bck bakterija u domaćinu uprkos antimikrobnoj terapiji (Savoia et Zucca, 2007).

#### **1.7 Osetljivost bakterija *B. cenocepacia* kompleksa na antimikrobne agense**

*B. cenocepacia* je urođeno rezistentna na polimiksine, aminoglikozide i većinu beta-laktamskih antibiotika, a u *in vivo* uslovima može da razvije rezistenciju na skoro sve klase antimikrobnih lekova. Rezistencija je posredovana različitim mehanizmima kao što su enzimska inaktivacija (beta-laktamaze, aminoglikozid-inaktivirajući enzimi), promena ciljnog mesta, nepropustljivost ćelijskog zida i aktivne efluks pumpe. Genom *B. cenocepacia* J2315 sadrži kodirajuće sekvence za svih pet glavnih familija efluks sistema (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010). Odsustvo vezujućeg mesta na lipopolisaharidu Bck bakterija za posledicu ima urođenu rezistenciju na katjonske

antimikrobne lekove, polimiksine i aminoglikozide (Cox et Wilkinson, 1991). Rezistencija na mnoge od dostupnih beta-laktamskih antibiotika je posledica kombinacije niske permeabilnosti spoljašnje membrane i inducibilnih hromozomskih beta-laktamaza (Poirel et al., 2009; Papp-Wallace et al., 2013). Postoji urođena rezistencija niskog stepena na imipenem, ali nema ukrštene rezistencije na meropenem koji ima dobru *in vitro* aktivnost (Philippon, 2010). U retke efikasne beta-laktame spadaju i piperacilin i ceftazidim. Fluorohinoloni, trimetoprim/sulfametoksazol, izvesni tetraciklini i hloramfenikol pokazuju aktivnost *in vitro*, ali u manjem stepenu (Philippon, 2010).

Stečena rezistencija je kod pacijenata sa CF česta jer su zbog egzacerbacija respiratornih infekcija izloženi selektivnom pritisku antibiotika tokom dužih vremenskih perioda (Leitão et al., 2008). Izolati Bck bakterija kod pacijenata sa CF su generalno rezistentniji od izolata kod drugih grupa pacijenata (LiPuma et al., 2001).

## **1.8 Radna hipoteza**

Sojevi Bck koji se izoluju kod pacijenata sa CF u našoj sredini su srodni ili identični onima koji su zastupljeni i u drugim zemljama Evrope.

## 2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi planiranih istraživanja su sledeći:

1. utvrditi učestalost kolonizacije Bck bakterijama kod pacijenata obolelih od CF koji se leče u Centru za cističnu fibrozu Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić”
2. izvršiti fenotipsku i genotipsku karakterizaciju izolata Bck bakterija izolovanih iz respiratornih uzoraka pacijenata obolelih od CF

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja formulisani su sledeći zadaci:

- izvršiti izolaciju i identifikaciju izolata Bck bakterija iz uzoraka respiratornog trakta pacijenata obolelih od CF standardnim bakteriološkim metodama i formirati kolekciju prikupljenih izolata
- genotipizacija izolata Bck bakterija elektroforezom na gelu u pulsirajućem polju (PFGE), analiza klonske distribucije i povezanosti ispitivanih izolata, i definisanje genotipova
- identifikacija izolata predstavnika različitih genotipova do nivoa vrsta Bck primenom PCR metode za amplifikaciju gena za 16S rRNK, PCR metode za amplifikaciju *recA* gena i MLST metode
- analiza populacione strukture i klonske povezanosti pomoću MLST analize
- ispitivanje patogenog potencijala predstavnika genotipova Bck ciljanom analizom genoma na prisustvo gena koji kodiraju sledeće faktore virulencije – „cable“ pile, BCESM, quorum sensing, flagelin, efluks pumpu, lipopolisaharid i sekretorni sistem tipa III
- ispitivanje sposobnosti adherencije za plastiku i produkcije biofilma
- fenotipsko ispitivanje osetljivosti na relevantne antimikrobne lekove, utvrđivanje postojanja rezistencije i njene učestalosti.

## **3 MATERIJAL I METODE**

### **3.1 Poreklo i izolacija sojeva**

#### **3.1.1 Bolesnici i period istraživanja**

Prospektivno istraživanje je sprovedeno u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić” i Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu. Studija je obuhvatila sve pacijente sa cističnom fibrozom (n=184) pregledane ili lečene u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić” u periodu od januara 2010. do decembra 2013., kada je kod njih rutinski sprovedena i mikrobiološka dijagnostika. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

#### **3.1.2 Definicija kolonizacije bakterijama *B. cepacia* kompleksa**

Hronična kolonizacija Bck bakterijama je definisana, prema tzv. “Leeds kriterijumima”, kao >50% pozitivnih uzoraka sakupljenih tokom 12 meseci, pri čemu su u tom periodu pregledana najmanje četiri uzorka. Intermitentna kolonizacija podrazumeva ≤50% kultura pozitivnih na Bck bakterije u istom periodu (Lee et al., 2003).

#### **3.1.3 Bakterijski izolati**

Kolekcija kliničkih izolata Bck je formirana skriningom uzoraka iz donjeg respiratornog trakta svih bolesnika sa CF tokom redovnih ambulantnih kontrola kao i tokom hospitalizacija. Uzorci su kultivisani na standardnim i selektivnim hranljivim podlogama prema uobičajenoj laboratorijskoj proceduri za obradu respiratornih uzoraka bolesnika sa CF, na krvni agar, čokoladni agar sa bacitracinom, manitol slani agar, McConkey agar, Sabouraud agar i OFPBL agar (BD, Heidelberg, Nemačka) (Kiska et

Riddell, 2012b). Podloge su inkubirane na temperaturi od 35°C prvih 48 sati, a zatim na sobnoj temperaturi do ukupno 5 dana. Kontrola porasta je vršena svakodnevno.

### 3.2 Fenotipska identifikacija izolata

Preliminarna, fenotipska identifikacija izolata izvršena je na osnovu porasta na visokoselektivnoj diferencijalnoj podlozi OFPBL agaru i biohemijskih identifikacionih testova korišćenjem Vitek 2 automatizovanog sistema i/ili API 20NE kita (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francuska).

Sačuvan je najmanje jedan izolat po bolesniku, a više izolata u slučaju kada su oni smatrani fenotipski različitim na osnovu kulturelnih i biohemijskih osobina i profila rezistencije na antimikrobne lekove. Takođe, kod bolesnika sa kliničkim pogoršanjem arhivirano je više izolata. Svi izolati su čuvani u Luria bujonu sa 15% glicerolom na -70°C.

### 3.3 Genotipizacija izolata elektroforezom na gelu u pulsirajućem polju (PFGE)

Genotipizacija svih izolata Bck iz kolekcije je izvršena PFGE metodom koju su opisali Heath i saradnici (2000). Bakterijske kulture su gajene do rane logaritamske faze u Luria-Bertani (LB) bujonu. Po jedan mililitar je odvojen i centrifugiran 1 minut na 13000 rpm. Čelije su oprane dva puta EET puferom (100 ml: 3,7 g EDTA, 0,38 g EGTA, 0,12 g Tris; pH se podešava sa NaOH na 7,8). Nakon centrifugiranja, ćelijski pelet je resuspendovan u 50 µL EET pufera i pomešan sa 50 µL rastopljene 1% agaroze, pa smeša stavljena u kalup i ostavljena na +4°C da se agar stegne. Rastvor 0,5% natrijum-dodecil-sulfata (SDS) i 200 mg proteinaze K u EET puferu je inkubiran na 50°C tokom 30 min da bi se aktivirala proteinaza K. Pojedinačni blokčići su inkubirani sa po 500 µL ovog rastvora preko noći na 50°C. Pod dejstvom SDS (deterdžent) koji razlaže lipide ćelijske membrane i proteinaze K koja razlaže proteine došlo je do lize bakterijskih ćelija *in situ* u agaroznom gelu i oslobođena DNK je ostala u blokčiću. Makrorestrikcija genomske DNK je vršena sa 20 U *SpeI* restriktionog enzima.

Restriktivni fragmenti DNK su razdvojeni elektroforezom u pulsirajućem polju pomoću 2015 Pulsator sistema (LKB Instruments, Broma, Švedska) opremljenog heksagonalnom elektrodom, tokom 18 h u TBE puferu na 9°C, u polju napona 300V. Gelovi su obojeni etidijum-bromidom i fotografisani pod UV osvetljenjem, a zatim analizirani vizuelnim poređenjem dobijenih profila. Izolati su smatrani genotipski identičnim ako su imali identične PFGE profile, u skladu sa kriterijumima Tenovera i saradnika (1995), i za potrebe ovog istraživanja definisani su kao pripadnici istog genotipa (pulsotipa). PFGE genotipovi su označavani rimskim brojevima.

Pored toga, napravljen je dendrogram korišćenjem Wardove metode korelacije koeficijentata između različitih PFGE profila pomoću SPSS softvera verzija 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

### **3.4 Identifikacija genotipova do nivoa vrsta *B. cepacia* kompleksa molekularnim metodama i molekularna tipizacija**

Nakon definisanja različitih genotipova, predstavnici svakog od genotipova su identifikovani do nivoa vrsta Bck sekvenciranjem gena za 16S rRNK, sekvenciranjem i filogenetskom analizom *recA* gena, MLST metodom i filogenetskom analizom konkatemera sedam alela korišćenih u MLST analizi.

#### **3.4.1 PCR metoda za amplifikaciju gena za 16S rRNK**

Za potvrdu fenotipske identifikacije predstavnika svakog od genotipova korišćena je PCR metoda za amplifikaciju gena za 16S rRNK, prema protokolu koji su opisali Jovčić i saradnici (2009). Korišćeni su prajmeri UNI 16SF (5'-GAGAGTTTGATCCTGGC-3') i UNI 16SR (5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3').

Umnožavanje gena za 16S rRNK PCR metodom vršeno je tako što je ukupna DNK svakog od izolata Bck (0,1–1 µg) pomešana sa 2,5 µl 10x reakcionog pufera ("Standard reaction buffer" sa Mg<sup>2+</sup>), smešom deoksinukleozid trifosfata (dNTP) (svaki dNTP po 200 µM), prajmerima (svaki po 2,5 µM finalno), prajmerima UNI 16SF i UNI 16SR

(finalno svaki 2 ng/μl), 0,25 μl *Taq* polimeraze (Kapabiosystems, SAD, 5 U/μl) i bidestilovanom vodom do finalne zapremine od 25 μl. PCR reakcije su rađene korišćenjem aparata GeneAmp 2700 PCR Cycler (Applied Biosystems, SAD), po šemi prikazanoj u Tabeli 2. Pri svakom postavljanju PCR reakcije kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša koja je imala sve prethodno navedene sastojke osim DNK matrice.

**Tabela 2.** Šema PCR reakcije za gen 16S rRNK

	Temperatura	Vreme	Faza reakcije
	96°C	5 min	Denaturacija dvolančane DNK
	96°C	30 s	Denaturacija
30 ciklusa PCR	55°C	30 s	Hibridizacija („annealing“)
	72°C	30 s	Elongacija
	72°C	5 min	Finalna elongacija

Dobijeni PCR produkti su prečišćeni GeneJET PCR Purification kitom (Thermo Scientific, Litvanija) i sekvencirani uslužno u centru za sekvenciranje Macrogen (Macrogen Inc., Holandija). Dobijene sekvence nukleotida su analizirane korišćenjem baze podataka BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*), dostupne na <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Nukleotidne sekvence su deponovane u Evropskoj arhivi nukleotida (engl. *European Nucleotide Archive*, ENA) sa pristupnim brojevima LT158012-LT158025 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LT158012-LT158025>).

### 3.4.2 PCR metoda za amplifikaciju *recA* gena

Amplifikacija *recA* gena je izvedena na izolatima reprezentativnim za svaki od genotipova, korišćenjem prajmera BCR1 (5'-TGACCGCCGAGAGAGCAA-3') i BCR2 (5'-CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC-3') prema protokolu koji su opisali Mahenthiralingam i saradnici (2000). Reakcionu smešu zapremine 25 μl činili su



ukupna DNK svakog od izolata Bck (10–50 ng), 2 ng/μl svakog od prajmera, 1 U *Taq* DNA polimeraze, po 250 mM svakog od dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> i 1x PCR pufer. Mikroeprovete sa reakcionim smešama su stavljane u termoblok aparata GeneAmp 2700 PCR Cycler (Applied Biosystems, SAD), a uslovi pod kojima su se odvijale reakcije lančanog umnožavanja predstavljeni su u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Šema PCR reakcije za *recA* gen

	Temperatura	Vreme	Faza reakcije
	96°C	5 min	Denaturacija dvolančane DNK
	94°C	30 s	Denaturacija
30 ciklusa PCR	58°C	45 s	Hibridizacija („annealing“)
	72°C	1 min	Elongacija
	72°C	10 min	Finalna elongacija

Dobijeni PCR produkti su prečišćeni GeneJET PCR Purification kitom (Thermo Scientific, Litvanija) i sekvencirani u centru za sekvenciranje Macrogen (Macrogen Inc., Holandija). Nukleotidne sekvence su deponovane u ENA sa pristupnim brojevima LT158026-LT158039 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LT158026-LT158039>).

### 3.4.3 Filogenetska analiza *recA* gena

Za konstruisanje *recA* filogenetskog stabla korišćene su nukleotidne sekvence *recA* gena različitih Bck vrsta iz LMG kolekcije koja je dostupna preko baze nukleotidnih sekvenci Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (engl. *National Center for Biotechnological Information*, NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): *B. cepacia* LMG1222 (I)(AF143786), *B. multivorans* LMG18824 (II)(AF143778), *B. cenocepacia* LMG18863 (IIIA)(AF143779), *B. cenocepacia* LMG16656 (IIIA)(AY951880), *B. cenocepacia* LMG16659 (IIIB)(AF143783), *B. cenocepacia* LMG18830 (IIIB)(AF143785), *B. cenocepacia* LMG21461 (IIID)(AF456021), *B. stabilis*

LMG14294 (IV)(AF456031), *B. vietnamiensis* LMG10929 (V)(AF143793), *B. ambifaria* LMG22485 (VII)(CP000151.1), *B. anthina* LMG16670 (VIII)(AF456060) i *B. pyrrocinia* LMG14191 (IX)(AY951906).

Filogenetska i molekularno-evolucionarna analiza su izvedene korišćenjem algoritama u okviru MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) softvera, verzija 6.0 (Tamura et al., 2013). MEGA6 softver je razvijen za potrebe komparativne analize DNK i proteinskih sekvenci na osnovu koje se može suditi o molekularnoj evoluciji gena, genoma i vrsta u funkciji vremena. Za konstruisanje *recA* filogenetskog stabla primenjena je metoda najveće verovatnoće (engl. *maximum-likelihood*) uz pomoć Jones-Taylor-Thornton (JTT) modela. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *recA* gen je korišćen u svrhu ukorenjivanja filogenetskog stabla.

#### **3.4.4 Molekularna tipizacija sojeva MLST metodom**

Tipizacija sojeva MLST metodom je izvršena prema metodologiji koju su opisali Spilker i saradnici (2009), kako bi se potvrdila identifikacija i utvrdilo postojanje klonalnosti izolata. MLST analiza je izvedena PCR amplifikacijom i sekvenciranjem sedam genskih lokusa (*atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC* i *trpB*) koji pripadaju “housekeeping” genima. Korišćeni prajmeri dati su u Tabeli 4. Amplifikacija ciljane DNK je izvođena sa zapreminom reakcione smeše od 25 µl koja je sadržala finalne koncentracije od 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 250 M svakog od dNTP (Fermentas, Litvanija), 0,4 M svakog od prajmera, 2 U *Taq* polimeraze (Kapa Biosystems, SAD) i 10–50 ng bakterijske DNK. PCR reakcije su rađene korišćenjem aparata GeneAmp 2700 PCR Cycler (Applied Biosystems, SAD), pod uslovima opisanim u Tabeli 5.

**Tabela 4.** Prajmeri za amplifikaciju sedam MLST lokusa *Burkholderia* spp.

Gen	Veličina produkta (bp)	Sekvence prajmera (5'→3')	Temperatura hibridizacije (°C)
<i>atpD</i>	756	ATGAGTACTRCTGCTTTGGTAGAAGG CGTGAAACGGTAGATGTTGTCG	56
<i>gltB</i>	652	CTGCATCATGATGCGCAAGTG CTTGCCGCGGAARTCGTTGG	58
<i>gyrB</i>	738	ACCGGTCTGCAYCACCTCGT YTCGTTGWARCTGTCGTTCCACTGC	60
<i>lepA</i>	975	CTSATCATCGAYTCSTGGTTCG CGRTATTCCTTGAACCTCGTARTCC	55
<i>phaC</i>	525	GCACSAGYATYTGCCAGCG CCATSTCSGTRCCRATGTAGCC	58
<i>recA</i>	704	AGGACGATTCATGGAAGAWAGC GACGCACYGAYGMRTAGAACTT	58
<i>trpB</i>	787	CGCGYTTCCGGVATGGARTG ACSGTRTGCATGTCCTTGTCG	58

**Tabela 5.** Šema PCR reakcije za MLST

	Temperatura	Vreme	Faza reakcije
	95°C	2 min	Denaturacija dvolančane DNK
	94°C	30 s	Denaturacija
30 ciklusa PCR	Temperatura odgovarajuća za prajmer (Tabela 4)	30 s	Hibridizacija („annealing“)
	72°C	60 s	Elongacija
	72°C	5 min	Finalna elongacija

Dobijeni PCR produkti su prečišćeni GeneJET PCR Purification kitom (Thermo Scientific, Litvanija) i sekvencirani u centru za sekvenciranje MacroGen (MacroGen Inc., Holandija). Specifični tipovi sekvenci analiziranih sojeva su određeni pomoću *Burkholderia cepacia* complex Multi Locus Sequence Typing veb-sajta (<http://pubmlst.org/bcc/>) koji su razvili Jolley i Maiden i u nadležnosti je Univerziteta u Oksfordu, Velika Britanija (Jolley et Maiden, 2010). Novi ST su deponovani u *Burkholderia cepacia* complex MLST bazu podataka.

### 3.4.5 Filogenetska analiza na osnovu konkatenata sekvenci sedam alela korišćenih u MLST analizi

Za konstrukciju filogenetskog stabla na osnovu konkatenata korišćene su nukleotidne sekvence sedam alela različitih Bck ST sa *Burkholderia cepacia* complex Multi Locus Sequence Typing veb-sajta (<http://pubmlst.org/bcc/>): *B. cenocepacia* genomvar IIIA ST32, *B. cenocepacia* genomvar IIIA ST28, *B. cenocepacia* genomvar IIIB ST39, *B. ambifaria* ST81, *B. vietnamensis* ST405, *B. stabilis* ST50, *B. stabilis* ST52 i 12 *B. multivorans* ST (ST16, ST17, ST18, ST21, ST24, ST181, ST190, ST195, ST198, ST270, ST274, i ST375). Konkatemere su kreirane korišćenjem alata sa Multi Locus Sequence Typing veb-sajta (<http://pubmlst.org/bcc/>). Filogenetska i molekularno-evolucionarna analiza su izvršene uz pomoć algoritama u okviru MEGA

softvera verzija 6.0 (Tamura et al., 2013). Za konstrukciju filogenetskog stabla baziranog na konkatenatama primenjena je metoda najveće verovatnoće (engl. *maximum-likelihood*).

### 3.4.6 PCR analiza sa prajmerima specifičnim za *B. cenocepacia* ST32

PCR analiza sa prajmerima specifičnim za *B. cenocepacia* ST32 je izvedena prema metodi koju su opisali Dedekova i saradnici (2013). Reakcionu smešu zapremine 20  $\mu$ l činili su ukupna DNK svakog od izolata Bck (1  $\mu$ l), i reagensi iz *Taq* PCR Core kita (Qiagen, Nemačka): 1 $\times$  PCR pufer, 1 $\times$  Q rastvor, 0,2 mM svakog od dNTP, po 0,5  $\mu$ M prajmera 1B\_325F (CCGTTGCATACCGTCCGAAATG) i prajmera 1B\_325R (CGCAGCAATGCACACGAGAAAG) i 0,75 U *Taq* polimeraze. Mikrorepruvete sa reakcionim smešama su stavljane u termoblok aparata GeneAmp 2700 PCR Cycler (Applied Biosystems, SAD), a uslovi pod kojima su se odvijale reakcije lančanog umnožavanja predstavljeni su u Tabeli 6. PCR produkti su razdvojeni na 2% gelu agaroze sa 1 $\times$  TBE puferom na 6 V/cm.

**Tabela 6.** Šema PCR reakcije za *B. cenocepacia* ST32

	Temperatura	Vreme	Faza reakcije
	94°C	5 min	Denaturacija dvolančane DNK
	94°C	30 s	Denaturacija
30 ciklusa PCR	60°C	45 s	Hibridizacija („annealing“)
	72°C	2 min	Elongacija
	72°C	10 min	Finalna elongacija

### 3.5 Ispitivanje prisustva markera epidemijskih sojeva, „cable“ pila i BCESM

Ispitivanje prisustva markera epidemijskih sojeva, „cable“ pila i BCESM, izvršeno je skriningom PCR metodom na prisustvo gena za „cable“ pilin (*cblA*) (Clode et al., 2000) i gena za BCESM (*esmR*) (Graindorge et al., 2010) za sojeve predstavnike svakog od PFGE tipova. Prajmeri korišćeni u ovim PCR reakcijama prikazani su u Tabeli 9.

**Gen *cblA*.** Amplifikacija ciljne DNK je izvođena sa zapreminom reakcione smeše od 25 µl koja je sadržala 100 pmol svakog od prajmera, 50 pmol MgCl<sub>2</sub>, 2,5 pmol svakog od dNTP, 1,25 U *Taq* DNK polimeraze i 2,5 ml 10x PCR pufera. PCR reakcije su rađene korišćenjem aparata GeneAmp 2700 PCR Cycler (Applied Biosystems, SAD), pod uslovima opisanim u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Šema PCR reakcije za *cblA* gen

	Temperatura	Vreme	Faza reakcije
	96°C	5 min	Denaturacija dvolančane DNK
	96°C	15 s	Denaturacija
25 ciklusa PCR	58°C	30 s	Hibridizacija („annealing“)
	72°C	90 s	Elongacija
	70°C	5 min	Finalna elongacija

**Gen za BCESM (*esmR*).** Amplifikacija ciljne DNK je izvođena sa zapreminom reakcione smeše od 25 µl koja je sadržala 10 pmol svakog od prajmera, 20 ng ciljne DNK, 50 pmol MgCl<sub>2</sub>, 2,5 pmol svakog od dNTP, 1,25 U *Taq* DNK polimeraze i 2,5 ml 10x PCR pufera. PCR reakcije su rađene korišćenjem aparata GeneAmp 2700 PCR Cycler (Applied Biosystems, SAD), pod uslovima opisanim u Tabeli 8.

**Tabela 8.** Šema PCR reakcije za BCESM

	Temperatura	Vreme	Faza reakcije
	94°C	5 min	Denaturacija dvolančane DNK
	94°C	30 s	Denaturacija
30 ciklusa PCR	62°C	30 s	Hibridizacija („annealing“)
	72°C	60 s	Elongacija
	72°C	5 min	Finalna elongacija

PCR produkti su prečišćeni GeneJET PCR Purification kitom (Thermo Scientific, Litvanija) i sekvencirani u centru za sekvenciranje Macrogen (Macrogen Inc., Holandija). Dobijene sekvence su poređene sa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) bazom sekvenci (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **3.6 Ispitivanje patogenog potencijala izolata detekcijom gena odgovornih za faktore virulencije**

Ispitivanje patogenog potencijala izolata izvršeno je skriningom PCR metodom na prisustvo gena odgovornih za quorum sensing (*cepI* i *cepR*) i gena koji učestvuju u regulaciji sinteze flagelina (*fliG*), efluks pumpe (*llpE*), lipopolisaharida (*wbiI*) i sekretornog sistema tipa III (*bcsV*). Prajmeri korišćeni u ovim PCR reakcijama prikazani su u Tabeli 9.

PCR reakcije su izvođene sa zapreminom reakcione smeše od 25 µl koja je sadržala 1 U *Taq* polimeraze, 200 µM svakog od dNTP, 1× PCR pufer, 5% DMSO, 1,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0,6 µmol/l svakog od prajmera i 10–50 ng ciljne DNK. PCR reakcije su rađene korišćenjem aparata GeneAmp 2700 PCR Cycler (Applied Biosystems, SAD), pod uslovima opisanim u Tabeli 10.

**Tabela 9.** Prajmeri korišćeni za detekciju gena za faktore virulencije *B. cepacia* kompleksa

Gen	Funkcija	Veličina produkta (bp)	Sekvence prajmera (5'→3')	Temperatura hibridizacije (°C)	Referenca
<i>cblA</i>	“Cable” pilus	664	cblAF CCAAAGGACTAACCCA cblAR AGCCGATGTCCATCACA	58	Clode et al. (2000)
<i>esmR</i>	BCESM	1418	BCESMF CCACGGACGTGACTAACA BCESMR CGTCCATCCGAACACGAT	62	Graindorge et al. (2010)
<i>cepI</i>	Quorum sensing	600	cepIF CCCTGTAAGAGTTACCAGTT cepIR GATATCGATCCAGCACGCCACGAC	56	Gotschlich et al. (2001)
<i>cepR</i>	Quorum sensing	450	cepRF CTGGATGGCGCACTACCAGGC cepRR ACGTGGAAGTTGACCGTCCGC	60	Gotschlich et al. (2001)
<i>fliG</i>	Flagelin	1000	fliGF ATGAACGCTGAAGGCTTGAC fliGR TCAGACATACGCGTCTTCC	56	Graindorge et al. (2010)
<i>llpE</i>	Efluks pumpa	625	llpEF GACCGGGTTGCCAGTAGTGC llpER CGTGCGTGATGTCCGGGTAG	55	Graindorge et al. (2010)
<i>wbiI</i>	LPS	542	wbiIF CCATGCGGCCGCGTACAAGCACGTGCC wbiIR TAGAGCTTCTCGCCCGGGCGCAG	52	Vinion-Dubiel et al. (2004)
<i>bpscV</i>	T3SS	379	bpscVF GCCCTTCACGAACTTCATC bpscVR GCTGCTGCTGTTTACGAC	53	Parsons et al. (2001)

LPS, lipopolisaharid; T3SS (engl. *type III secretion system*), sekretorni sistem tipa III



**Tabela 10.** Šema PCR reakcije za faktore virulencije

	Temperatura	Vreme	Faza reakcije
	95°C	5 min	Denaturacija dvolančane DNK
	95°C	45 s	Denaturacija
35 ciklusa PCR	Temperatura odgovarajuća za prajmer (Tabela 9)	45 s	Hibridizacija („annealing“)
	72°C	1 min	Elongacija
	72°C	5 min	Finalna elongacija

### 3.7 Metode rada sa DNK

#### 3.7.1 Izolacija ukupne bakterijske DNK

Ekstrakcija ukupne bakterijske DNK izvršena je metodom baziranom na lizi ćelija korišćenjem 2% SDS. Po 1,5 ml bakterijske kulture u dekstroznom bujonu stare 18–24 h centrifugirano je 5 minuta na 13000 rpm (5415D Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Nakon odvajanja supernatanta, bakterijski pelet je opran u 500 µl TEN pufera (50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA i 50 mM NaCl, pH 8,0). Liza ćelija je izvršena dodavanjem 250 µl 2% SDS, a DNK je potom prečišćena od proteina i lipida dodavanjem 250 µl neutralnog fenola. Prečišćavanje je ponavljano do gubitka interfaze. Nakon centrifugiranja 10 minuta na 13000 rpm (centrifuga 5804, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) odvajana je vodena faza, iz koje je vršena precipitacija DNK dodavanjem 0,7 zapremine izopropanola i 0,1 zapremine 3M Na-acetata. Ukupna DNK je taložena centrifugiranjem na 13000 rpm (centrifuga 5804, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) tokom 20 minuta, a zatim je vršeno njeno pranje 75% etanolom. Nakon centrifugiranja na 13000 rpm tokom 5 minuta i odlivanja supernatanta, pelet je sušen na 37°C. DNK je zatim resuspendovana u bidestilovanoj vodi u koju je dodata RNKaza i inkubirana na

37°C tokom 15 minuta, čime je uklonjena RNK. Dobijena DNK je čuvana na -20°C do upotrebe.

### **3.7.2 Elektroforeza DNK**

Elektroforeza DNK rađena je na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u 1x TAE puferu (40 mM Tris-acetat, 2 mM EDTA, finalno pH 8,0) uz dodavanje etidijum-bromida (0,5 µm/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je 1x TAE. Agarozni gelovi različitog procenta su korišćeni u zavisnosti od veličine fragmenata koje je trebalo razdvojiti. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1–10 V/cm gela. Veličine fragmenata DNK određivane su na agaroznim gelovima upoređivanjem dužine puta ispitivane DNK trake u odnosu na dužinu puta koju su prešli DNK fragmenti poznate veličine. Korišćen je DNK standard „Gene-Ruler 100 bp DNA ladder“ (MBI Fermentas, Litvanija).

### **3.7.3 Elucija DNK fragmenata**

Elucija DNK fragmenata dobijenih PCR metodom iz agaroznog gela vršena je pomoću QIAquick Gel Extraction kita (Qiagen, Nemačka) po uputstvu proizvođača.

### 3.8 Formiranje biofilma

U skladu sa protokolom koji su predložili Stepanović i saradnici (2000), a uz izmene, vršena je analiza formiranja biofilma. U bunarčiče mikrotitarske ploče (Sarstedt, Nemačka), pored 180  $\mu$ l LB medijuma, dodato je i po 20  $\mu$ l tečne bakterijske kulture stare 18–24 h. Svaki izolat je testiran u triplikatu. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, za koji je poznato da formira biofilm, a kao negativna kontrola *Escherichia coli*, soj DH5 $\alpha$ , koji ne formira biofilm. Osim toga, ostavljena su i 3 bunarčiča sa neinokulisanim LB medijumom. Nakon inkubacije od 48 h na 37°C, ploče su isprane 3 puta u destilovanoj vodi, u cilju odstranjivanja neadheriranih ćelija, a zatim sušene na 65°C do potpunog isparavanja tečnosti. Bojenje je vršeno 0,1% kristal violetom (HiMedia, Mumbai, Indija), 200  $\mu$ l po bunarčiču, a zatim je ploča inkubirana na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min. Boja je potom odlivena, a ploča sušena na 65°C. Višak boje je odstranjen ispiranjem destilovanim vodom (3x). Nakon poslednjeg ispiranja, ploča je snažno otresena. Resolubilizacija boje koja se vezala za ćelije vršena je dodavanjem 200  $\mu$ l po bunarčiču rastvora etanol/acetona (80:20). Nakon 10 minuta na sobnoj temperaturi izmeren je nivo apsorbance na 595 nm, korišćenjem čitača Infinite M200 PRO (Tecan, Männedorf, Švajcarska).

Sojevi su klasifikovani u skladu sa formulama:

$OD \leq OD_c$	soj ne stvara biofilm
$OD_c < OD \leq 2*OD_c$	soj stvara malu količinu biofilma
$2*OD_c < OD \leq 4*OD_c$	soj stvara umerenu količinu biofilma
$4*OD_c < OD$	soj stvara veliku količinu biofilma

$OD_c$  se izračunava kao srednja vrednost OD negativne kontrole (samo LB medijum) plus 3 standardne devijacije (Stepanović et al., 2000).

### 3.9 Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove

#### 3.9.1 Ispitivanje osetljivosti na antibiotike disk difuzionom metodom

Preliminarno ispitivanje osetljivosti na relevantne antibiotike izvršeno je standardnom disk difuzionom metodom prema preporukama američkog Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standard Institute*, CLSI) (CLSI, 2012).

Komercijalno dostupne ploče Mueller-Hinton agara (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska) zasejavane su bakterijskom suspenzijom gustine 0,5 McFarlanda. Testirano je sedam antimikrobnih lekova koji su standardizovani za testiranje prema CLSI M100-S24 dokumentu (CLSI, 2014). Korišćeni su sledeći antibiogram diskovi: tikarcilin/klavulanska kiselina (75 µg/10 µg), ceftazidim (30 µg), meropenem (10 µg), hloramfenikol (30 µg), minociklin (30 µg), levofloksacin (5 µg) i trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75 µg) (BioRad, Marnes-la-Coquette, Francuska). Nakon inkubiranja od 18–24 h na 35°C pod aerobnim uslovima, mereni su prečnici zona inhibicije rasta. Sojevi su označeni kao osetljivi (S), intermedijarno osetljivi (I) i rezistentni (R). Tumačenje rezultata izvršeno je prema CLSI preporukama (CLSI, 2014). Kako za Bck nisu definisane specifične CLSI granične vrednosti osetljivosti za testiranje tikarcilin/klavulanata, levofloksacina i hloramfenikola disk difuzijom, ovi rezultati su tumačeni na osnovu CLSI graničnih vrednosti za *P. aeruginosa* (tikarcilin/klavulanat i levofloksacin) i Enterobacteriaceae (hloramfenikol).

Za kontrolu kvaliteta korišćeni su ATCC sojevi *P. aeruginosa* 27853, *Escherichia coli* 25922 i 35218.

#### 3.9.2 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije E-testom

Za odabrane izolate određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) relevantnih antibiotika primenom E-testa. Da bi se izbeglo dupliranje, određivanje MIK nije ponavljano na izolatima koji su imali identičan PFGE profil i antibiogram a izolovani su kod istog pacijenta.

E-test trake (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska) su korišćene po standardnoj proceduri za izvođenje E-testa, a po preporuci proizvođača. Testirani su sledeći antibiotici: tikarcilin/klavulanat, ceftazidim, meropenem, minociklin, levofloksacin, trimetoprim/sulfametoksazol i hloramfenikol. Komercijalno dostupne ploče Mueller-Hinton agara (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska) zasejavane su bakterijskom suspenzijom gustine 0,5 McFarlanda. Nakon inkubiranja od 18–24 h na 35°C pod aerobnim uslovima, očitavane su MIK vrednosti i tumačene u skladu sa interpretativnim standardima datim u Tabeli 11.

Za kontrolu kvaliteta E-test traka, Mueller-Hinton agara i procedure korišćeni su ATCC sojevi *P. aeruginosa* 27853, *Escherichia coli* 25922 i 35218.

MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> su definisane kao koncentracije kod kojih je 50% odnosno 90% izolata bilo inhibirano.

**Tabela 11.** Interpretativni standardi za minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za *Burkholderia cepacia* prema CLSI, 2014

Antibiotik	Interpretativni kriterijumi MIK (µg/ml)		
	S	I	R
Tikarcilin/klavulanat	≤16/2	32/2–64/2	≥128/2
Ceftazidim	≤8	16	≥32
Meropenem	≤4	8	≥16
Minociklin	≤4	8	≥16
Levofloksacin	≤2	4	≥8
Trimetoprim/ sulfametoksazol	≤2/38	-	≥4/76
Hloramfenikol	≤8	16	≥32

### 3.10 Obrada rezultata

U statističkoj obradi rezultata korišćene su metode deskriptivne statistike, pri čemu su izračunavane ukupna prevalencija Bck kolonizacije tokom perioda istraživanja, godišnja prevalencija i godišnja incidencija.

Rezultati dobijeni PFGE metodom su analizirani međusobnim vizuelnim poređenjem dobijenih profila.

Za analizu podataka dobijenih MLST metodom je korišćena baza podataka na sajtu <http://pubmlst.org/bcc>.

Za statističku obradu rezultata ispitivanja sposobnosti produkcije biofilma izolata Bck korišćen je hi-kvadrat test ( $p < 0,05$  je statistički značajna razlika).

## 4 REZULTATI

### 4.1 Bolesnici

U četvorogodišnjem periodu istraživanja (2010.–2013.), u Centru za cističnu fibrozu u Beogradu je praćeno i lećeno 184 pacijenata (odnos muškog i ženskog pola 0,86:1). Bakterije *B. cepacia* kompleksa su izolovane kod 50 pacijenata (23 muškog i 27 ženskog pola). Uzrast pacijenata u vreme prve izolacije Bck je iznosio od 2 meseca do 35 godina (srednja vrednost uzrasta 11,1 godina; medijana 9,05 godina). Ukupno, 39/50 (78%) kolonizovanih pacijenata je bilo mlađe od 18 godina u vreme prve izolacije Bck bakterija, a 36/50 (72%) mlađe od 15 godina.

### 4.2 Prevalencija i incidencija kolonizacije bakterijama *B. cepacia* kompleksa

Ukupna prevalencija Bck kolonizacije tokom perioda istraživanja bila je 27,2%. Godišnja prevalencija tokom prve tri godine istraživanja iznosila je 23,2%–23,7%, a 2013. godine pala na 17,6%. Godišnja incidencija se kretala od 3,4% do 8,1% tokom prve tri godine istraživanja. U 2013. godini nije bilo novih pacijenata sa Bck kolonizacijom (Tabela 12).

Hronično kolonizovanih pacijenata je ukupno bilo 34/184 (18,5%), a 14/184 (7,6%) je bilo intermitentno/tranzitorno kolonizovanih. Dvoje pacijenata je izgubljeno iz praćenja, a kako je kod njih Bck bakterija izolovana u samo jednom uzorku, nije bilo moguće utvrditi da li se radi o hroničnoj ili tranzitornoj kolonizaciji. Kod jednog od njih izolovana je *B. stabilis*.

**Tabela 12.** Incidencija i prevalencija infekcija bakterijama *B. cepacia* kompleksa u periodu od 2010. do 2013. godine

Godina	Broj pacijenata sa CF	Broj (%) pacijenata sa Bck		
		Incidencija	Prevalencija	
			Ukupno	Hronično kolonizovani
2010	135	11 (8,1)	32 (23,7)	24 (17,8)
2011	146	5 (3,4)	34 (23,3)	22 (15,1)
2012	164	11 (6,7)	38 (23,2)	28 (17,1)
2013	170	0 (0)	30 (17,6)	25 (14,7)

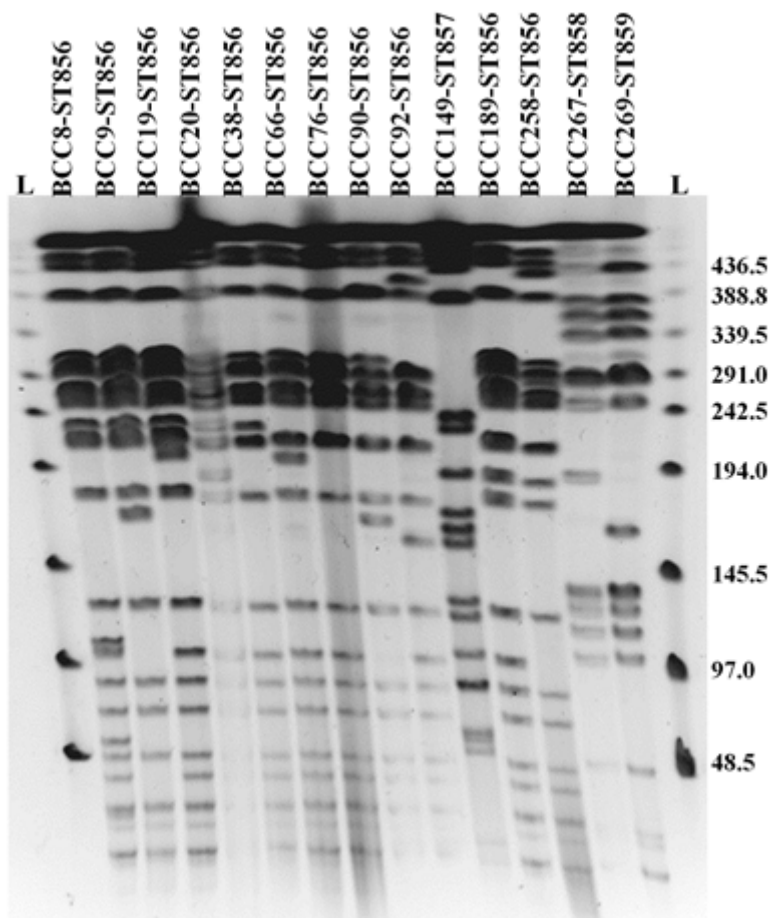
#### 4.3 Bakterijski izolati

Uzorci iz respiratornog trakta su mikrobiološki obrađivani na tri do četiri meseca tokom redovnih kontrola radi praćenja kliničkog statusa pacijenata, a češće kod pacijenata kod kojih je nastupilo kliničko pogoršanje. Tokom perioda istraživanja sačuvana su 182 izolata, i to iz sputuma (n=141), dubokih briseva ždrele (n=34), bronhoalveolarnih lavata (n=5) i endotrahealnih aspirata (n=2). Pojedinačni izolati sačuvani su kod 18 pacijenata, dok je kod 32 pacijenta sačuvano više od jednog izolata (od 2 do 19).



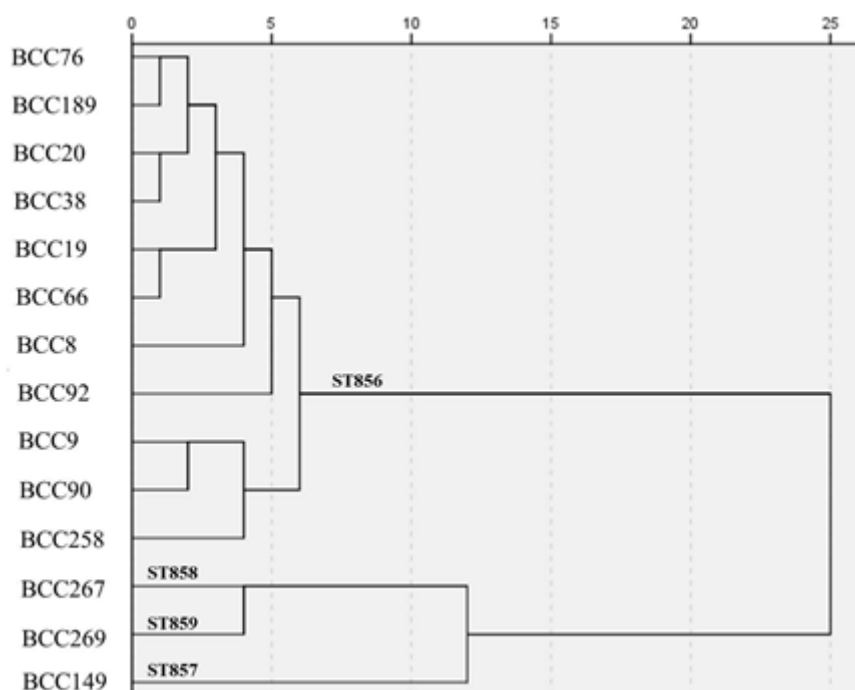
#### 4.4 Genotipizacija PFGE metodom

Svih 182 izolata je podvrgnuto tipiziranju PFGE metodom i utvrđeno je postojanje 14 genotipova (pulsotipova), obeleženih rimskim brojevima od I do XIV (Slika 6). Četiri pulsotipa su identifikovana kod više od jednog pacijenta (3 do 33 pacijenta). Kod 17 pacijenata ustanovljeno je prisustvo više različitih pulsotipova (2 do 6) i po pravilu se radilo o hronično kolonizovanim pacijentima.



**Slika 6.** PFGE profili reprezentativnih *B. cepacia* kompleks izolata. Rezultati identifikacije MLST analizom (ST) su označeni pored naziva soja (BCC). L –  $\lambda$  konkatemera (New England Biolabs, SAD). Brojevi označavaju veličinu DNK traka  $\lambda$  konkatemere u kilobazama.

Statističkom obradom rezultata PFGE analize za 14 reprezentativnih predstavnika svakog od pulsotipova (BCC8, BCC9, BCC19, BCC20, BCC38, BCC66, BCC76, BCC90, BCC92, BCC149, BCC189, BCC258, BCC267 i BCC269) pokazano je da su na osnovu srodnosti grupisani u tri grupe, pri čemu je najbrojnija grupa obuhvatila čak 11 reprezentativnih pulsotipova. Razlike u dobijenim pulsotipovima su u okviru svake grupe bile <10%, dok su razlike između pulsotipova različitih grupa iznosile >10% (Slika 7).



**Slika 7.** Dendrogram *SpeI* PFGE profila napravljen korišćenjem Wardove metode korelacije koeficijenata između PFGE profila različitih genotipova. Predstavnici svakog od genotipova su na levoj strani dendrograma. Brojevi označavaju procenat razlike među genotipovima. MLST identifikacija je označena na kladama.

## 4.5 Molekularno-genetička analiza

Četnaest izolata predstavnika svakog od pulsotipova (BCC8, BCC9, BCC19, BCC20, BCC38, BCC66, BCC76, BCC90, BCC92, BCC149, BCC189, BCC258, BCC267 i BCC269), podvrgnuto je daljim molekularnim testovima, identifikaciji do nivoa vrsta Bck primenom PCR metode za amplifikaciju 16S rDNK, PCR metode za amplifikaciju *recA* gena i sekvenciranje istog, i MLST analizi.

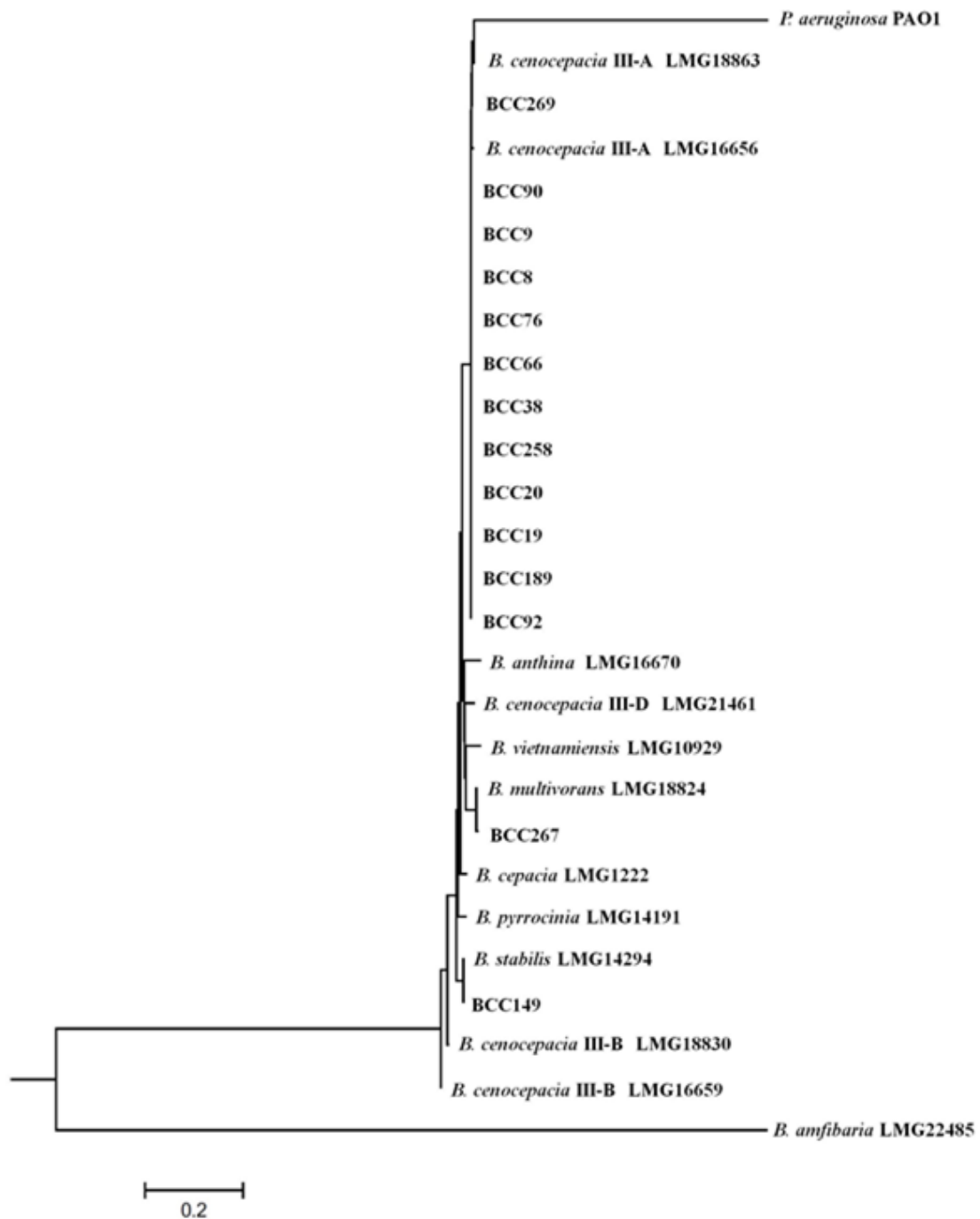
### 4.5.1 Identifikacija sekvenciranjem gena za 16S rRNK

Preliminarna molekularna identifikacija na osnovu umnožavanja 16S rRNA gena PCR metodom i sekvenciranjem potvrdila je da svi izolati pripadaju Bck vrstama. Svi izolati osim BCC149 su ovom metodom identifikovani kao *B. cenocepacia*, a BCC149 je identifikovan kao *B. stabilis*.

### 4.5.2 Sekvenciranje *recA* gena i filogenetska analiza sekvenci *recA* gena

PCR metodom za amplifikaciju Bck *recA* gena i naknadnim sekvenciranjem svi izolati su identifikovani kao Bck vrste. Svi izolati osim BCC149 su ovom metodom identifikovani kao *B. cenocepacia*, a BCC149 je identifikovan kao *B. stabilis*.

Filogenetskom analizom *recA* sekvenci poređene su sekvence *recA* gena naših izolata i *recA* sekvence referentnih sojeva iz LMG kolekcije čime je omogućena identifikacija genomovara kojima su pripadali testirani izolati i utvrđeno je da je 12 pulsotipova (BCC8, BCC9, BCC19, BCC20, BCC38, BCC66, BCC76, BCC90, BCC92, BCC189, BCC258 i BCC269) pripadalo *B. cenocepacia* IIIA liniji, BCC267 je pripadao *B. multivorans* II, a BCC149 je pripadao *B. stabilis* IV (Slika 8).

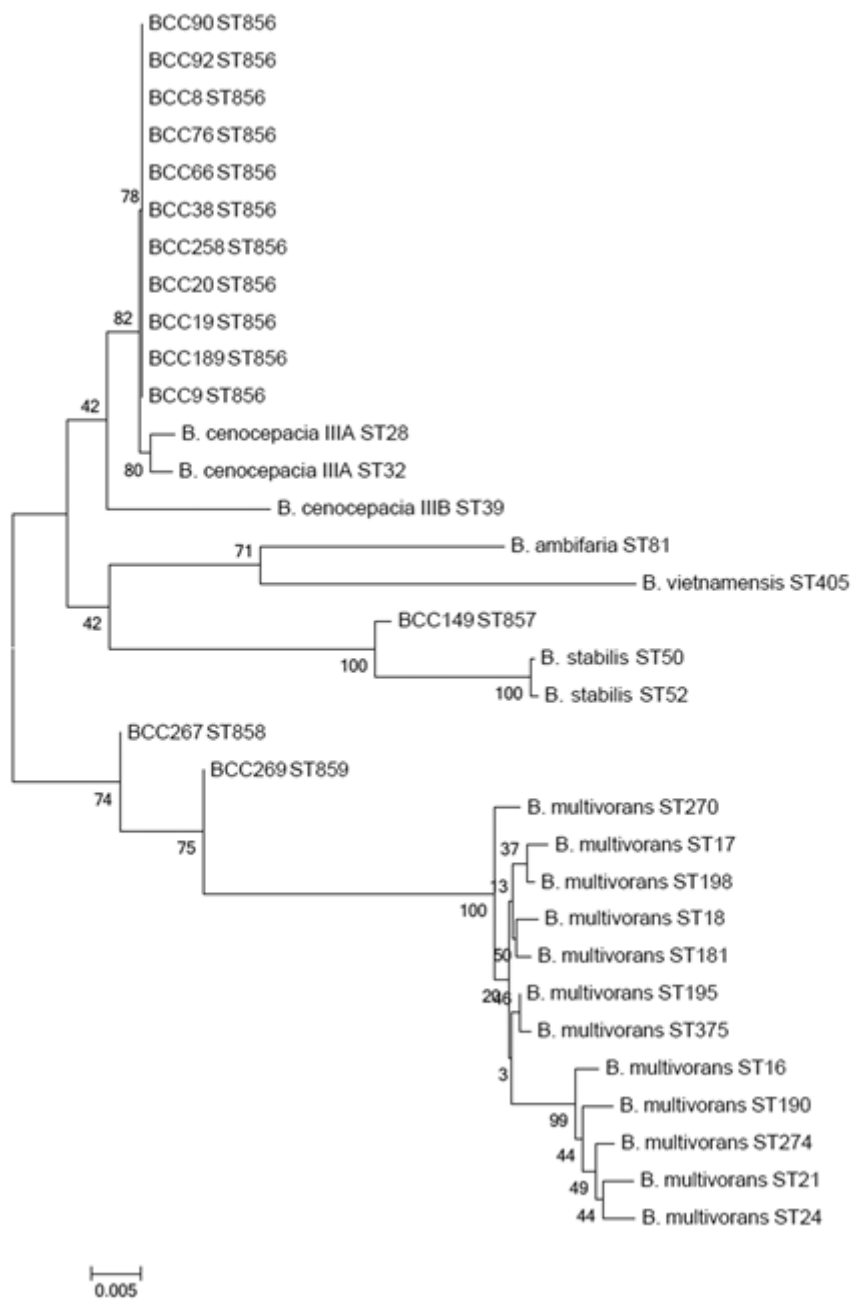


**Slika 8.** Filogenetsko stablo izvedeno iz sekvenci *recA* gena 14 izolata *Burkholderia cepacia* kompleksa iz Srbije i referentnih sojeva različitih Bcc vrsta iz LMG kolekcije.

### 4.5.3 Tipizacija sojeva MLST metodom

MLST analizom izolati su identifikovani kao dve vrste klasifikovane u četiri ST: 11 reprezentativnih sojeva (BCC8, BCC9, BCC19, BCC20, BCC38, BCC66, BCC76, BCC90, BCC92, BCC189 i BCC258) je identifikovano kao *B. cenocepacia* ST856, BCC267 kao *B. cenocepacia* ST858, BCC269 kao *B. cenocepacia* ST859, a BCC149 kao *B. stabilis* ST857. Sva četiri ST su bili novi, prvi put opisani u ovom istraživanju. ST856 je najbliži epidemijском soju *B. cenocepacia* ST32 (svi aleli su identični osim *gyrB* alela). Pored toga, ST858 i ST859 su slični *B. cenocepacia* ST208 koji pripada klonalnom kompleksu 31 (Slika 9).

Identifikacija Bck sojeva MLST analizom se slagala sa identifikacijom izvršenom analizom *recA* gena za sve izolate, osim za jedan (BCC267) koji je *recA* PCR metodom identifikovan kao *B. multivorans*. S obzirom na delimično neslaganje MLST analize i filogenetske analize sekvenci *recA* gena, izvršeno je i poređenje konkatenata sedam analiziranih alela korišćenih u MLST analizi sa konkatenatima alela već opisanih ST iz MLST baze podataka. Dobijeni rezultati su pokazali da iako su MLST analizom BCC267 i BCC269 identifikovani kao *B. cenocepacia*, filogenetska analiza ukazuje da su srodniji sojevima iz MLST baze podataka koji su identifikovani kao *B. multivorans*.



**Slika 9.** Filogenetska analiza izolata *B. cepacia* kompleksa iz Srbije i reprezentativnih sojeva *B. cepacia* kompleksa iz baze MLST na osnovu konkatena sedam alela

*B. cenocepacia* ST856 je bio izrazito dominantan i nađen je kod 48/50 (96%) pacijenata, uključujući dva para blizanaca. Kod osam od ovih 48 pacijenata ova bakterija je izolovana prilikom prvog dolaska u Centar. Preostala dva pacijenta su bila kolonizovana unikatnim sojevima Bck. *B. cenocepacia* ST858 i ST859 su izolovane iz sputuma jedne pacijentkinje kod koje je hronična kolonizacija trajala najmanje šest godina (ona je jedna od prva tri pacijenta kod kojih je Bck bakterija izolovana 2005. godine kada je započet sistematski skrining respiratornih uzoraka u Centru). *B. stabilis* ST857 je identifikovana kod jedne pacijentkinje.

Kod svih pacijenata kod kojih su sačuvani multipli izolati ustanovljeno je da su nosili genetički srodne sojeve tokom celog perioda istraživanja, odnosno kod njih nije došlo do superinfekcije ili zamene drugim Bck sojem.

#### **4.5.4 PCR specifičan za *B. cenocepacia* ST32**

PCR analiza sa prajmerima specifičnim za soj *B. cenocepacia* ST32 izvršena je na 11 reprezentativnih izolata ST856 (BCC8, BCC9, BCC19, BCC20, BCC38, BCC66, BCC76, BCC90, BCC92, BCC189 i BCC258). Dobijen je negativan rezultat PCR, što pokazuje da se ST856 ne može smatrati varijantom ST32.

#### 4.6 Epidemijski markeri “cable” pilin i BCESM

*cblA* gen je bio prisutan kod 11 od 14 pulsotipova (BCC8, BCC9, BCC19, BCC20, BCC38, BCC66, BCC76, BCC90, BCC92, BCC189 i BCC258) koji su pripadali *B. cenocepacia* ST856. Kod preostala tri soja, *B. cenocepacia* ST858 i ST859 i *B. stabilis* ST857 nije dokazano prisustvo *cblA* gena.

Prisustvo *esmR* gena koji kodira BCESM dokazano je kod istih 11 izolata kod kojih je i *cblA* bio pozitivan (Tabela 13).

#### 4.7 Detekcija gena odgovornih za faktore virulencije

PCR analiza na prisustvo 6 genetičkih determinanti udruženih sa virulencijom (*cepI*, *cepR*, *fliG*, *llpE*, *wbiI* i *bcscV*) izvršena je kod 14 Bck sojeva predstavnika svakog od genotipova.

Geni *cepI* i *cepR* koji regulišu quorum sensing, gen *wbiL* koji učestvuje u sintezi lipopolisaharida i gen *bcscV* koji je odgovoran za sintezu sekretornog sistema tipa III su detektovani kod svih izolata.

Gen *llpE* koji učestvuje u sintezi efluks pumpe detektovan je kod svih sojeva osim kod BCC267 i BCC269 (Tabela 13).

Specifičnost PCR umnožavanja potvrđena je i sekvenciranjem dobijenih PCR amplikona.



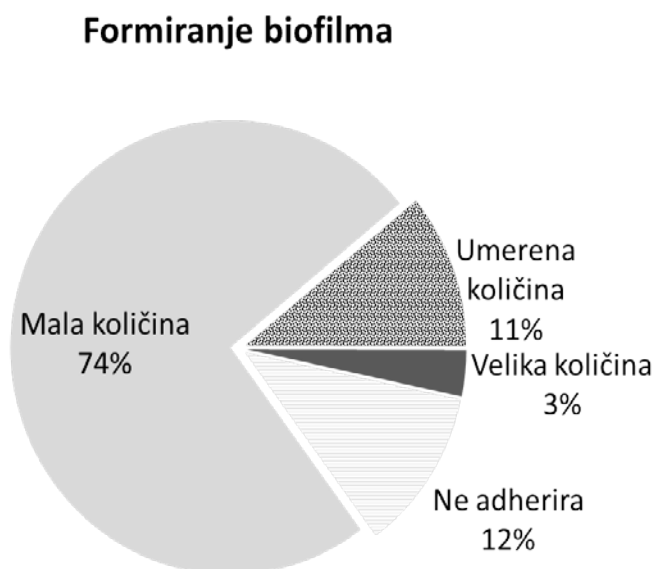
**Tabela 13.** Rezultati ispitivanja determinanti virulencije *B. cepacia* kompleksa

Izolat	ST	<i>cblA</i>	<i>esmR</i>	<i>cepI</i>	<i>cepR</i>	<i>fliG</i>	<i>llpE</i>	<i>wbiL</i>	<i>bcscV</i>
BCC8	856	+	+	+	+	+	+	+	+
BCC9	856	+	+	+	+	+	+	+	+
BCC19	856	+	+	+	+	+	+	+	+
BCC20	856	+	+	+	+	+	+	+	+
BCC38	856	+	+	+	+	+	+	+	+
BCC66	856	+	+	+	+	+	+	+	+
BCC76	856	+	+	+	+	+	+	+	+
BCC90	856	+	+	+	+	+	+	+	+
BCC92	856	+	+	+	+	+	+	+	+
BCC149	857	-	-	+	+	+	+	+	+
BCC189	856	+	+	+	+	+	+	+	+
BCC258	856	+	+	+	+	+	+	+	+
BCC267	858	-	-	+	+	+	-	+	+
BCC269	859	-	-	+	+	+	-	+	+

*cepI* i *cepR*, quorum sensing; *fliG*, flagelin; *llpE*, efluks pumpa; *wbiL*, lipopolisaharid; *bcscV*, sekretorni sistem tipa III

#### 4.8 Formiranje biofilma

Analiza sposobnosti formiranja biofilma izolata Bck vršena je kristal violet testom na mikrotitar pločama. U odnosu na predloženu klasifikaciju biofilмова, izolati su okarakterisani kao slabi, srednji ili jaki proizvođači biofilma ili kao sojevi koji ne adheriraju na mikrotitar ploču. Od 182 testirana izolata u uslovima u kojima smo analizirali sposobnost formiranja biofilma, najveći broj (135 izolata – 74,2%) pripadao je slabim proizvođačima biofilma. Jake biofilmove je formiralo 3,3% izolata (n=6), srednje biofilmove 11,0% izolata (n=20), dok 11,5% izolata (n=21) nije adheriralo za plastiku mikrotitar ploče (Grafikon 1).



**Grafikon 1.** Formiranje biofilma izolata *Burkholderia cepacia* kompleksa

Analizirana je razlika u sposobnosti formiranja biofilma između izolata koji potiču od hronično kolonizovanih pacijenata i izolata poreklom od tranzitorno kolonizovanih pacijenata. Nije bilo statistički značajne razlike između ove dve grupe izolata ( $p=0,787$ ;  $p>0,5$ ) (Tabela 14).

**Tabela 14.** Rezultati ispitivanja sposobnosti formiranja biofilma u odnosu na dužinu trajanja kolonizacije (n=182)

	Ne stvaraju biofilm (0)	Stvaraju biofilm		
		+	++	+++
Hronično kolonizovani (n=161)	19	118	18	6
Tranzitorno kolonizovani (n=21)	2	17	2	0

+ mala količina biofilma, ++ umerena količina biofilma, +++ velika količina biofilma

#### 4.9 Evaluacija osetljivosti na antibiotike E-testom

Nakon preliminarnog ispitivanja osetljivosti na antibiotike disk difuzionom metodom, izdvojeno je 95 izolata Bck (93 *B. cenocepacia*, 2 *B. stabilis*) kod kojih je osetljivost na sedam standardizovanih antibiotika dalje testirana E-test metodom. Kod 31 pacijenta testiran je po jedan izolat. Kod 19 pacijenata testirani su multipli izolati, od 2 do 9 (ukupno 64 izolata). Multipli izolati poreklom od istog pacijenta su odabrani ako su pripadali različitim pulsotipovima, ili su pripadali istom pulsotipu ali su imali različite profile osetljivosti pri preliminarnom testiranju.

Od ispitivanih antibiotika, meropenem je imao najbolju inhibitornu aktivnost (72,6% osetljivih sojeva), praćen ceftazidimom (71,6%). Od ne-beta-laktamskih antibiotika, minociklin je imao najbolju antimikrobnu aktivnost (40% osetljivih sojeva). Najslabiju aktivnost pokazali su tikarcilin/klavulanat i trimetoprim/sulfametoksazol sa 1,1% odnosno 4,2% osetljivih sojeva. Kod hronično kolonizovanih pacijenata, meropenem i ceftazidim su takođe pokazali najbolju efikasnost, ali je procenat osetljivih izolata bio manji u odnosu na vrednosti dobijene za sve testirane izolate (meropenem 65,3%, ceftazidim 64%). Nešto manju efikasnost u grupi izolata poreklom od hronično kolonizovanih pacijenata pokazali su i ostali testirani antibiotici.

Na trimetoprim/sulfametoksazol su bili osetljivi samo izolati *B. cenocepacia* ST858 i ST859 i *B. stabilis* ST857, a svi testirani izolati predstavnici dominantnog *B. cenocepacia* ST856 klona bili su rezistentni na ovaj antibiotik.

Rezultati ispitivanja osetljivosti (MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub>, raspon MIK vrednosti i kvalitativna kategorizacija) su prikazani u Tabeli 15.

Zapažena je značajna varijabilnost profila osetljivosti kod klonalnih izolata poreklom od perzistentno kolonizovanih pacijenata (Tabela 16).

Multirezistentni izolati (rezistentni na tri ili više klasa antibiotika) su bili zastupljeni u značajnom broju. Izolacija multirezistentnih varijanti je češće bila udružena sa hroničnom infekcijom (Tabela 16). Posmatrano u celini, multirezistentnih izolata je bilo 82,1%, a u grupi izolata od hronično kolonizovanih pacijenata nešto više, 86,7%.

**Tabela 15.** Osetljivost sojeva *B. cepacia* kompleksa ispitivana metodom E-testa

Antibiotik	MIK ( $\mu\text{g/ml}$ )			Ispitivani sojevi (%)*		
	50%	90%	Opseg	S	I	R
<b>Osetljivost Bck sojeva (n=95) svih kolonizovanih pacijenata</b>						
Tikarcilin/ klavulanat	>256	>256	<0,016–>256	1,1	1,1	97,9
Ceftazidim	3	64	1–>256	71,6	10,5	17,9
Meropenem	3	24	0,5–32	72,6	14,7	12,6
Minociklin	8	32	0,75–>256	40	21,1	38,9
Levofloksacin	4	>32	0,5–>32	36,8	31,6	31,6
TMP/SMZ**	>32	>32	0,094–>32	4,2	0	95,8
Hloramfenikol	32	>256	4–>256	22,1	22,1	55,8
<b>Osetljivost Bck sojeva (n=75) hronično kolonizovanih pacijenata</b>						
Tikarcilin/ klavulanat	>256	>256	<0,016–>256	1,3	1,3	97,3
Ceftazidim	4	64	1,2–>256	64	13,3	22,7
Meropenem	3	32	0,5–32	65,3	18,7	16
Minociklin	8	32	1–>256	33,3	24	42,7
Levofloksacin	4	>32	0,75–>32	30,7	36	33,3
TMP/SMZ**	>32	>32	0,5–>32	2,7	0	97,3
Hloramfenikol	32	>256	4–>256	20	18,7	61,3

\*S, I i R, osetljiv, intermedijaran i rezistentan, tim redosledom. Granične vrednosti za osetljive, intermedijarne i rezistentne sojeve su: tikarcilin/klavulanat,  $\leq 16$ , 32 do 64,  $i \geq 128/2 \mu\text{g/ml}$ ; ceftazidim,  $\leq 8$ , 16  $i \geq 32 \mu\text{g/ml}$ ; meropenem,  $\leq 4$ , 8  $i \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ; minociklin  $\leq 4$ , 8  $i \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ; levofloksacin  $\leq 2$ , 4  $i \geq 8 \mu\text{g/ml}$ ; TMP/SMZ,  $\leq 2$   $i \geq 4 \mu\text{g/ml}$ ; hloramfenikol,  $\leq 8$ , 16  $i \geq 32 \mu\text{g/ml}$ . \*\*TMP/SMZ, trimetoprim/sulfametoksazol

**Tabela 16.** Profili osetljivosti na antimikrobne lekove izolata *B. cepacia* kompleksa (n=95)

Pacijent	Tip kolonizacije	Izolat	Genotip	Vrsta/ST	TCC	CAZ	MER	MNC	LVX	TS	CL
1	nepoznato	BCC149	XIV	<i>B. stabilis</i> ST 857	R	S	S	R	S	S	S
		BCC150	XIV	<i>B. stabilis</i> ST 857	R	S	S	S	S	S	S
2	hronična	BCC18	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	I	I	S	R	I
		BCC19	V	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	I	S	R	S	R	I
		BCC20	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	S	R	R
		BCC56	IX	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	R	R	R	R	R
3	nepoznato	BCC138	IX	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
4	hronična	BCC104	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	S	R	I
		BCC178	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	S	R	S
5	tranzitorna	BCC11	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
6	hronična	BCC11	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
7	hronična	BCC6	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	R	R	S
		BCC75	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	R	R	I
8	hronična	BCC115	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
9	tranzitorna	BCC224	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
10	hronična	BCC25	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
11	hronična	BCC270	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	I	R	I	R	R
12	hronična	BCC43	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S

Pacijent	Tip kolonizacije	Izolati	Genotip	Vrsta/ST	TCC	CAZ	MER	MNC	LVX	TS	CL
13	hronična	BCC203	IX	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
14	tranzitorna	BCC252	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
15	hronična	BCC227	IX	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
16	hronična	BCC199	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
		BCC258	XI	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	I	S	R	R	R	R
17	tranzitorna	BCC273	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	S	R	S
18	hronična	BCC272	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
19	hronična	BCC84	IX	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
20	hronična	BCC44	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	R	R	I
		BCC63	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	I	S	S	I	R	S
		BCC212	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	R	I	R	R	I
		BCC66	VI	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	I	S	I	R	S
		BCC76	I	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	R	I	I	R	R
		BCC64	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	I	I	I	R	R	S
		BCC97	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	I	I	I	R	R	I
		BCC204	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	I	S	S	R	R	I
		BCC205	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	I	S	I	R	R
21	tranzitorna	BCC254	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
		BCC255	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
22	hronična	BCC29	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R

Pacijent	Tip kolonizacije	Izolat	Genotip	Vrsta/ST	TCC	CAZ	MER	MNC	LVX	TS	CL
		BCC119	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	I	I	R	R	I
		BCC98	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
		BCC261	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	R	R	R	R	R
23	hronična	BCC5	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
24	hronična	BCC1	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
		BCC128	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
		BCC129	I	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
25	hronična	BCC49	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	I	R	I
26	tranzitorna	BCC201	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
27	hronična	BCC107	IX	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
28	hronična	BCC267	XII	<i>B. cenocepacia</i> ST858	S	S	S	R	I	S	I
		BCC269	XIII	<i>B. cenocepacia</i> ST859	R	R	I	R	I	S	I
29	tranzitorna	BCC95	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	S	R	S
30	tranzitorna	BCC58	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	I	R	I
		BCC99	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	S	R	I
31	hronična	BCC2	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
		BCC59	IX	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	S	R	S
32	tranzitorna	BCC47	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	S	R	S
33	tranzitorna	BCC8	VII	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	I	R	I
34	hronična	BCC39	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	S	R	S



Pacijent	Tip kolonizacije	Izolat	Genotip	Vrsta/ST	TCC	CAZ	MER	MNC	LVX	TS	CL
35	hronična	BCC226	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	I	R	I
		BCC117	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
		BCC218	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
36	hronična	BCC247	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	S	R	S
37	hronična	BCC244	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
38	tranzitorna	BCC245	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
39	tranzitorna	BCC196	IX	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
40	hronična	BCC148	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	I	R	I	R	I
		BCC228	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
41	hronična	BCC38	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	I	R	I
		BCC231	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
		BCC229	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	R	R	R	R	I
		BCC230	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	I	I	S	R	S
		BCC243	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	I	I	R	S	R	S
42	tranzitorna	BCC21	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	S	S	R	S
43	tranzitorna	BCC9	IX	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	S	R	S
44	hronična	BCC12	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	I	R	R	R	I
		BCC146	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	I
		BCC238	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	I	R	I
		BCC253	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	I	I	R	I	R	I

Pacijent	Tip kolonizacije	Izolat	Genotip	Vrsta/ST	TCC	CAZ	MER	MNC	LVX	TS	CL
		BCC90	X	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	R	R	R
		BCC92	VIII	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	I	R	I	R	R
		BCC147	IX	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	R	R	R	R	I
		BCC190	IX	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	I	S	R	S	R	S
		BCC189	II	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	R	R	I	R	I
45	hronična	BCC61	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	I	S	S	R	R	R	R
46	hronična	BCC100	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	I	R	R
		BCC159	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	I	R	I
47	hronična	BCC7	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	R	R	S	R	S
48	hronična	BCC24	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	R	S	R	I
		BCC40	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	I	S	S	R	R	I
		BCC81	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	R	R	S	R	I
		BCC162	I	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	R	R	R	R	R
		BCC163	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	R	R	I	R	I
		BCC166	III	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	R	R	R	R	R	R
49	tranzitorna	BCC130	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	S	R	S
50	hronična	BCC94	IV	<i>B. cenocepacia</i> ST 856	R	S	S	I	S	R	S

ST, tip sekvence; TCC, tikarcilin/klavulanat; CAZ, ceftazidim; MER, meropenem; MNC, minociklin; LVX, levofloksacin; TS, trimetoprim/sulfametoksazol; CL, hloramfenikol

## 5 DISKUSIJA

Bakterije koje pripadaju Bck su značajni oportunistički patogeni kod osoba obolelih od CF zbog nepredvidljivog ponašanja sa pojavom naglog kliničkog pogoršanja kod nekih pacijenata, sposobnosti da se lako prenose između pacijenata u bolničkim i vanbolničkim uslovima, i urođene i stečene rezistencije na antimikrobne lekove. Pojava epidemijskih sojeva je dobro dokumentovana, a njihovo širenje među pacijentima sa CF može da bude posledica interhumanog prenosa ili izloženosti izvoru kontaminacije (Govan et al., 2007; Nelson et al., 1991).

Studija koju su realizovali Isles i saradnici (1984) u Kanadi je bila jedna od prvih epidemioloških studija koja je pokazala značaj Bck bakterija u populaciji pacijenata sa CF. Ubrzo se pojavilo još nekoliko studija iz SAD, Kanade, Velike Britanije, Italije, Francuske i Portugala (LiPuma et al., 1988; Govan et al., 1993; Smith et al., 1993; Cazolla et al., 1996; Segonds et al., 1997; Richau et al., 2000). Nakon naglog porasta broja obolelih tokom 1980-ih i ranih 1990-ih godina, incidencija Bck infekcija je u većini razvijenih zemalja počela da pada tokom druge polovine 1990-ih i ranih 2000-ih godina zahvaljujući opsežnim merama koje su primenjene kako bi se kontrolisalo njihovo širenje (LiPuma, 2010). Poslednjih godina, širenje pojedinih genotipova Bck je ograničeno na manji broj pacijenata u okviru jednog CF centra ili jednog regiona. U odsustvu epidemijskog načina širenja, prevalencija generalno iznosi <10% (Govan, 2006) i distribucija Bck vrsta je raznovrsnija (De Boeck et al., 2004). Uglavnom se radi o sporadičnim infekcijama, što je sada slučaj u većini evropskih zemalja, ali situacija može značajno da varira između različitih zemalja i između pojedinačnih CF centara.

Zbog ovakve varijabilnosti, dostupni podaci ne odlikavaju pravu situaciju u nekim delovima Evrope i sveta, posebno u zemljama u kojima se izdvajaju ograničena sredstva za zdravstvenu zaštitu i u kojima nije moguće u potpunosti primeniti zahtevne standarde nege kao što su oni koje preporučuje ECFS (Conway et al., 2014).

Za razliku od zemalja zapadne i severne Evrope, u zemljama balkanskog regiona i istočnoevropskim zemljama je epidemiologija Bck infekcija uglavnom nepoznata. Jedine dostupne informacije odnose se na prevalenciju hroničnih infekcija u jednom broju zemalja i nalaze se u godišnjim izveštajima ECFS (ECFS Patient Registry Annual Data Report), a u poslednja dva izveštaja su podaci za 2010. i 2013. godinu (Tabela 17). Međutim, ove podatke je teško međusobno porediti zbog različitog stepena obuhvata pacijenata u pojedinim zemljama koji se kreće od 11–20% (Rumunija, Ukrajina i Grčka) do 100% (Danska), i činjenice da su u nekim zemljama učestvovali samo pojedinačni centri za CF a u drugima su podaci dobijeni iz nacionalnih registara za CF. Za Srbiju jedini podaci potiču iz Centra za CF na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić”, sa obuhvatom od preko 90% pacijenata sa CF u Srbiji (Zolin et al., 2014; Zolin et al., 2016).

**Tabela 17.** Prevalencija hronične infekcije bakterijama *B. cepacia* kompleksa u zemljama Evrope (prilagođeno iz ECFS Patient Registry Annual Report 2010 i 2013)

Zemlja	Hronična kolonizacija (% pacijenata)	
	2010. godina	2013. godina
Austrija	2,7	2,6
Belgija	1,7	2,9
Češka	2,5	8,7
Danska	6,2	6,0
Francuska	1,4	1,1
Grčka	1,0	0,0
Holandija	1,7	1,9
Irska	/	2,3
Italija	2,3	2,6
Latvija	3,3	8,6
Litvanija	/	23,1
Mađarska	3,2	1,8
Portugal	8,7	6,6
Rusija	8,4	7,8
Slovačka	4,2	6,7
Slovenija	0,0	3,7
Srbija	13,2	14,9
Španija	3,0	4,4
Švajcarska	2,7	2,6
Švedska	2,2	3,1
Velika Britanija	3,0	3,6

Postoji velika potreba da se utvrdi lokalna prevalencija i identifikuju vrste Bck koje cirkulišu u sredinama za koje nedostaju precizni podaci, kao i da se utvrdi da li se pretežno radi o infekcijama nastalim sporadično ili u okviru epidemijskog širenja Bck bakterija. Ove informacije imaju ključni značaj za primenu odgovarajućih mera prevencije i kontrole infekcija, ali i za kliničko zbrinjavanje bolesnika.

Prema podacima iz godišnjeg izveštaja ECFS za 2010. godinu, Srbija je te godine imala najveći broj pacijenata hronično kolonizovanih Bck (13,2%) (Zolin et al., 2014). Prema izveštaju za 2013. godinu, Srbija je na drugom mestu sa 14,9%, iza Litvanije koja je imala 23,1% hronično kolonizovanih pacijenata. Međutim, treba naglasiti da se podaci iz Litvanije odnose na samo 13 pacijenata iz jednog adultnog centra za CF, što predstavlja ukupni obuhvat od 20% pacijenata (100% odraslih i 0% dece) (Zolin et al., 2016).

U našem istraživanju koje je obuhvatilo period od četiri godine, ukupna prevalencija kolonizacije Bck je bila 27,2%, a 18,4% pacijenata je bilo hronično kolonizovano. Godišnja prevalencija tokom prve tri godine istraživanja iznosila je 23,2–23,7%, a 2013. godine pala na 17,6%. Prevalencija hronično kolonizovanih pacijenata se kretala između 14,7% i 17,8%, što je značajno više u odnosu na ostale evropske zemlje.

Nakon kolonizacije Bck bakterijama većina pacijenata razvije hroničnu infekciju (Coutinho et al., 2011; De Boeck et al., 2004; Horsley et al., 2011). Studija Coutinho i saradnika (2011) je pokazala da su u Portugalu pedijatrijski pacijenti sa CF češće imali hronične nego tranzitorne infekcije. Studija Ramsay i saradnika (2013) je dala drugačije rezultate, i u njihovoj grupi pacijenata kod mlađih pacijenata infekcija je češće bila tranzitorna, a kad je bila tranzitorna javljala se kod pacijenata sa boljom plućnom funkcijom. Moguće je da je na ovu razliku značajno uticao program eradikacije novonastale Bck infekcije koji je sproveden, i u literaturi za to postoje određeni dokazi (Horsley et al., 2011). Međutim, može doći i do spontane rezolucije infekcije, što je već pokazano kod pacijenata sa CF kolonizovanih drugim patogenim bakterijama kao što je MRSA (Garske et al., 2004). U našoj studiji, većina Bck-pozitivnih pacijenata, 34/50 (68%) je razvila hroničnu kolonizaciju.

Danas, u Severnoj Americi i većini zapadnoevropskih zemalja Bck infekcije su do četiri puta češće kod odraslih (>15 godina) nego kod pedijatrijskih pacijenata (Horsley et al., 2011). U tim zemljama broj novoinficiranih pacijenata je generalno značajno opao tokom godina, a osobe koje su ranije kolonizovane Bck bakterijama polako stare (CFC, 2015). Nasuprot tome, u našem Centru, u periodu trajanja istraživanja, srednji uzrast pacijenata u vreme prve kolonizacije Bck bakterijama je iznosio 11 godina (medijana je 9 godina), a najmlađi pacijent je kolonizovan u uzrastu od 2 meseca. Ukupno 39/50 (78%) pacijenata je bilo mlađe od 18 godina a 36/50 (72%) mlađe od 15 godina u vreme prve izolacije Bck. Ovako velika zastupljenost Bck kolonizacije u pedijatrijskom uzrastu se nameće kao značajan problem jer je poznato da je to faktor koji dugoročno pogoršava prognozu osnovne bolesti. De Boeck i saradnici (2004) su utvrdili da na početku kolonizacije Bck bakterijama nije bilo značajne razlike u parametrima plućne funkcije između Bck-pozitivnih pacijenata i kontrolne grupe Bck-negativnih pacijenata. Međutim, pet godina kasnije mortalitet je bio veći a pogoršanje funkcije pluća brže kod kolonizovanih pacijenata.

Kako bismo procenili epidemiološku srodnost Bck izolata kod naših pacijenata sa CF, izvršena je genotipizacija PFGE metodom koja je pokazala postojanje 14 pulstipova. Ipak, genetička raznovrsnost može da se smatra skromnom jer je većina izolata pripadala jednom od dva predominantna genotipa, dok su ostali genotipovi bili predstavljeni sa relativno malim brojem izolata. Takođe, od 50 kolonizovanih pacijenata čak 48 je bilo kolonizovano sojevima sa sličnim PFGE profilom, što ukazuje da se radi o epidemiološki srodnim sojevima i verovatnom interhumanom prenosu.

Iako PFGE predstavlja zlatni standard među tehnikama genotipizacije za mnoge bakterijske patogene, poznato je da korisnost ove metode za genotipizaciju *B. cenocepacia* nije uvek jednoznačna, posebno kada se ispituju velike populacije ovih mikroorganizama (Coenye et al., 2002). Veoma visoka diskriminatorsna moć može da bude mač sa dve oštrice u smislu tačnog određivanja epidemiološke povezanosti među izolatima jer se njihovi profili nekada ne grupišu zajedno iako pripadaju istom klonu. Naime, uprkos činjenici da kompjuterski softver može da pomogne u grupisanju blisko srodnih PFGE profila, nekada je teško primeniti kriterijume za analizu podataka i dobijeni rezultati mogu da budu teški za tumačenje. To se pokazalo kao problem i u

nekim prethodnim epidemiološkim analizama, na primer kod čeških kliničkih izolata *B. cenocepacia*. U Češkoj je tokom kasnih 1990-ih i početkom 2000-ih godina oko 30% pacijenata sa CF bilo kolonizovano epidemijskim klonom *B. cenocepacia* CZ1. Skoro svi sojevi su prvobitno karakterisani tehnikama genotipizacije koje se zasnivaju na poređenju odgovarajućih DNK profila izolata, PFGE i RAPD. Identifikovano je 77 PFGE profila koji su se međusobno razlikovali i do osam traka. Međutim, RAPD analiza iste grupe izolata je pokazala da su svi bili klonalni i pripadali soju CZ1 (Drevinek et al., 2005). MLST metodom je pokazano da svi CZ1 izolati pripadaju ST32, čime su potvrđeni rezultati prethodne RAPD analize (Drevinek et al., 2010).

Poznato je da su Bck bakterije i drugi članovi roda *Burholderia* mikroorganizmi sa veoma izraženom sposobnošću adaptacije, sa genomima koji mogu da pokazuju visok stepen rekombinacija (Mahenthiralingam et al., 2008). Drevinek et al. (2010), su postavili hipotezu da je visoka heterogenost PFGE profila kod čeških izolata rezultat genomskih rearanžmana nastalih kao posledica kretanja insercionih sekvenci (IS), kojima Bck genom obiluje, u uslovima oksidativnog stresa. Ovo kretanje IS može da promeni PFGE profile izolata koji se identifikuju kao klonalni na osnovu drugih metoda tipizacije. Na osnovu podataka dostupnih iz sekvenciranog genoma soja *B. cenocepacia* J2315 (ST28), koji je blisko srodan soju CZ1, ovi autori su izabrali četiri IS elementa koji su imali najveći broj kopija u genomu J2315 (IS407, ISBcen8, ISBcen9 i ISBcen20) i testirali su CZ1 genom na prisustvo homologa. ISBcen20 i ISBcen8 su pronađene kod svih ispitivanih izolata CZ1 klona, a posebno je ISBcen20 pokazala značajnu varijabilnost u broju kopija i genomskoj distribuciji. Značajne promene u broju kopija i insercionim mestima ISBcen20 homologa u uslovima izloženosti vodonik-peroksidu uočene kod izolata istog soja poreklom od CF pacijenata, i činjenica da ova aktivnost može da se detektuje nakon samo nekoliko sati rasta u takvoj atmosferi, ukazuju na kapacitet nekih sojeva *B. cenocepacia* za brzu evoluciju posredovanu IS. Slična varijabilnost je uočena i kod nekih drugih epidemijskih sojeva *B. cenocepacia*, na primer ST28 (ET12) i ST234 (RAPD 04).

Oksidativni stres je inherentno svojstvo respiratornog trakta pacijenata sa CF. Hronično zapaljenje u njihovim plućima doprinosi visokom sadržaju reaktivnih kiseoničnih radikala, koje produkuje imunski sistem domaćina kao odgovor na



infekciju. CF patogeni su razvili različite mehanizme zaštite od reaktivnih kiseoničnih radikala kako bi izvršili uspešnu kolonizaciju pluća. Tako, *B. cenocepacia* poseduje antioksidantne enzime superoksid dismutazu, katalazu i katalazu-peroksidazu (Lefebvre et Valvano, 2001), a dolazi i do indukcije proteina rezistencije na vodonik-peroksid (Drevinek et al., 2008). Iako ovi mehanizmi pomažu opstanak bakterija u disajnim putevima, oni ne mogu da neutrališu sve kiseonične radikale koji stoga i dalje utiču na neke procese koji se odigravaju u bakterijama na molekularnom nivou (Drevinek et al., 2010).

Ipak, transpozonska aktivnost ISBcen20 može da bude tek jedan od elemenata koji posreduju u promenama u PFGE profilima putem mehanizama DNK rearanžmana i rekombinacije. Naime, malo je verovatno da insercija samo jedne male IS može da se detektuje direktno pomoću PFGE. Takođe, pošto ISBcen20 nema ciljnu sekvencu za restrikcioni enzim *SpeI* koji se obično koristi za PFGE analizu, alteracije koje su detektovane PFGE metodom su verovatno rezultat opsežnijih genomskih rekombinacija. Prema tome, verovatnije je da se pod dejstvom oksidativnog stresa aktiviraju multipli mobilni elementi, a kumulativni efekat ovih dešavanja se na kraju manifestuje kao promena u PFGE profilima. Prema tome, ovaj mehanizam predstavlja oblik brze evolucije koja može da se odigra kod *B. cenocepacia* tokom infekcije i može posredno da objasni pojavu multiplih pulsotipova i u našoj studiji, posebno kod hronično kolonizovanih pacijenata od kojih su neki imali i do šest različitih pulsotipova.

Teškoće vezane za metode tipizacije koje podrazumevaju elektroforezu na gelu su tokom poslednjih desetak godina prevaziđene alternativnim pristupom, MLST analizom, koja poredi nukleotidne sekvence sedam konzerviranih, “housekeeping” gena Bck (Spilker et al., 2009). MLST analiza Bck ima nekoliko prednosti: (i) kako je MLST zasnovana na analizi DNK sekvenci, sve informacije o tipovima sekvenci mogu da se čuvaju u javnoj bazi podataka što omogućuje poređenje rezultata među laboratorijama; (ii) MLST omogućuje genotipizaciju sojeva, ali i identifikaciju izolata do nivoa vrste, što je olakšalo nedavnu karakterizaciju nekoliko novih Bck vrsta (Vanlaere et al., 2008; Vanlaere et al., 2009); (iii) MLST ima izvanrednu moć rezolucije, što je omogućilo poređenje klonalnih izolata iz spoljašnje sredine sa kliničkim izolatima (Baldwin et al., 2007), kao i praćenje globalne distribucije najvažnijih Bck klonova (Drevinek et

Mahenthiralingam, 2010; Baldwin et al., 2008). Kako MLST analizira komponente konzerviranog genoma Bck bakterija, malo je verovatno da na njega utiču genomski rearanžmani unutar ovih bakterija.

MLST analiza je i u našoj studiji primenjena u cilju konačne identifikacije izolata i ispitivanja klonaliteta. Ovom analizom potvrđen je visok nivo klonalnosti Bck bakterija u našoj populaciji bolesnika sa CF. Od 182 Bck izolata, identifikovane su samo dve vrste, *B. cenocepacia* i *B. stabilis* i četiri nova ST-a, prvi put opisana u ovoj studiji. Jedan od njih, *B. cenocepacia* ST856, nađen je kod 48 (96%) pacijenata. ST856 je najbliži češkom epidemijском soju CZ1 (ST32). ST32 je globalno rasprostranjen, dominantno klinički soj koji je bio veoma prevalentan kod pacijenata sa CF u Češkoj tokom kasnih 1990-ih i ranih 2000-ih godina, a bio je dokazan i u epidemijama u drugim zemljama (Francuskoj, Italiji, Velikoj Britaniji i Kanadi) (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010).

Međutim, komparativna analiza PFGE makrorestrikcionih profila ST32 koje su dobili Dedeckova i saradnici (2013) pokazala je da ovi izolati dele samo između 60% i 70% identičnosti između DNK traka iz makrorestrikcionih profila. Kada smo ih uporedili sa *SpeI* makrorestrikcionim profilima 11 sojeva iz naše studije koji su pripadali različitim pulsotipovima u PFGE ali su identifikovani kao ST856 MLST analizom, zaključili smo da je makrorestrikciona heterogenost još veća. Takođe, PCR sa prajmerima specifičnim za ST32 koji su opisali Dedeckova i saradnici (2013) je bio negativan, što navodi na zaključak da naš soj ST856 ne može da se smatra varijantom ST32.

S obzirom na genetičku sličnost ST856 i ST32, moguće je da ova dva klona vode poreklo od zajedničkog pretka i možda dele sličnu ekološku nišu. Nije jasno kako se soj ST32 proširio na veliki broj zemalja, ali moguće je da je on ili stanovnik neke ekološke niše kojoj su izloženi mnogi pacijenti sa CF, ili se raširio kao posledica kontaminacije različitih medicinskih proizvoda ili proizvoda za domaćinstvo koje osobe sa CF uobičajeno koriste (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010). Različite vrste bakterija koje pripadaju Bck su nađene u brojnim kozmetičkim proizvodima, šamponima, sapunima, tečnostima za ispiranje usne duplje, flaširanoj mineralnoj vodi i drugim proizvodima

koji se nalaze u širokoj upotrebi (Saiman et al., 2014; Baldwin et al., 2007; Nzula et al., 2000). Prethodna istraživanja su ukazala i na mogućnost da ljudi dođu u kontakt sa ST32 direktno iz prirode jer je ovaj soj nađen i u kliničkim izolatima, i u izolatima iz životne okoline (Baldwin et al., 2007). Međutim, u našem istraživanju nisu testirani uzorci iz spoljašnje sredine što ograničava mogućnost donošenja zaključaka o ulozi životne okoline kao rezervoara sojeva Bck koji kolonizuju pacijente u našem CF centru.

U studiji je ispitivano i prisustvo markera epidemijskih sojeva, gena za “cable” pilin (*cblA*) i BCESM. Svi izolati koji su pripadali epidemijskom soju ST856 koji pripada *recA* grupi IIIA bili su pozitivni na oba markera. I pored sličnosti našeg soja sa ST32 na osnovu rezultata MLST analize, bitna razlika je da ST856 sadrži i *cblA* gen za koji se smatra da se skoro isključivo nalazi kod sojeva ET12 linije, dok ST32 poseduje BCESM, kao i drugi *B. cenocepacia* epidemijski sojevi IIIA linije, ali ne i *cblA* gen. Iako nijedan od ovih markera nije pouzdan pokazatelj transmisivnosti ili virulencije (Govan et al., 2007; Govan, 2006), oni su dokazani kod nekih od najvirulentnijih i najtransmisivnijih klonova (ET12, sicilijanski *B. cenocepacia* IIIA izolati) (Govan, 2006; Agodi et al., 2001) i moguće je da su doprineli brzom širenju klona ST856 među pacijentima našeg Centra. Zanimljivo je da je genetička nestabilnost dokumentovana i kod *esmR* gena i kod *cblA* gena. Agodi i saradnici (2001) su utvrdili da iako je većina pacijenata uključenih u epidemijsko širenje *B. cenocepacia* na Siciliji bila kolonizovana sojevima koji su posedovali *cblA* gen, 5/26 (19%) pacijenata je bilo kolonizovano *cblA*-negativnom varijantom istog klona, što ukazuje da u tom genomskom regionu može da postoji određena nestabilnost. Kod *cblA*-negativnih varijanti klona uočene su male promene u PFGE profilima, što može da bude udruženo sa genomskim rearanžmanom i gubitkom *cblA* gena.

Analizom *recA* gena ustanovljeno je da je *B. cenocepacia* IIIA bila dominantno zastupljena (98% pacijenata), identifikovana je kod svih pacijenata osim kod jedne pacijentkinje. IIIA linija je prethodno dokazana kao najzastupljenija u populaciji pacijenata sa CF u Italiji i Češkoj, kao i u Kanadi i Velikoj Britaniji (Drevinek et Mahenthiralingam, 2010; Agodi et al., 2001). Za soj *B. cenocepacia* ST856 identifikacija analizom *recA* gena se poklapala sa rezultatima identifikacije MLST analizom.

Međutim, identifikacija do nivoa vrste za izolate BCC267 (ST858) i BCC269 (ST859), koji se razlikuju u jednom genskom lokusu, je bila veoma delikatna i predstavljala je izazov. Interesantno je da za ove sojeve rezultati analize evolucione udaljenosti između *recA* alela nisu bili u skladu sa rezultatima MLST analize, s obzirom na to da su na osnovu analize *recA* gena oni bili grupisani kao *B. multivorans*, dok su prema MLST shemi označeni kao *B. cenocepacia* IIIA ali novi ST-ovi (ST858 i ST859). PFGE profili ovih izolata su se značajno razlikovali od dominantnog klona ST856, što je potvrdila i analiza konkatena. Iako je MLST analiza pokazala da je ovim sojevima najbližija *B. cenocepacia* ST208, oni su identični u samo 4 lokusa. U cilju preciznije identifikacije, za konstrukciju filogenetskog stabla na bazi konkatena uključili smo nukleotidne sekvence 11 dodatnih *B. multivorans* ST-ova (ukupno 12 *B. multivorans* ST), i ST858 i ST859 su se grupisali sa *B. multivorans* ST-ovima. Drugi ST-ovi koji ne pripadaju *B. multivorans* nisu analizirani zbog očigledne filogenetske divergencije ST858 i ST859 u odnosu na druge Bck vrste na osnovu konkatena sedam alela. Dodatni kontrolni sojevi *B. multivorans* nisu promenili poziciju ST858 i ST859 u filogenetskom stablu čime je potvrđeno pravilno filogenetsko grupisanje.

Ipak, ovakva neslaganja nisu neuobičajena, i ograničenja u identifikaciji genomovara na osnovu analize sekvence *recA* gena su uočena i ranije kod *B. multivorans*. Tako, Slinger i saradnici (2011) su razvili test za identifikaciju Bck vrsta pirosekvenciranjem (engl. *pyrosequencing*) varijabilnog segmenta *recA* gena i testirali 45 izolata Bck (15 referentnih sojeva i 30 kliničkih izolata). Sva tri testirana soja *B. multivorans* su bila identifikovana kao *B. multivorans/B. ambifaria*, što ukazuje da su kod nekih sojeva *B. multivorans* neophodne dodatne procedure identifikacije kao što su sekvenciranje dužeg segmenta ili celog *recA* gena. Takođe, pirosekvenciranje dodatnog segmenta *recA* gena bi potencijalno omogućilo bolje diferenciranje, mada takav esej još uvek nije razvijen. Teškoće u diferenciranju nekih vrsta Bck mogu da se objasne pretpostavkom da je generalno malo verovatno da velike populacije srodnih bakterija mogu da se podele u jasno odvojene klastere, već one pre predstavljaju genetički kontinuum gde precizne podele nisu uvek moguće, kao što su postulirali Vandamme i Dawyndt (2011). Naime, visoke vrednosti DNK–DNK hibridizacije među vrstama, prisustvo velikog broja intermedijarnih vrednosti DNK–DNK hibridizacije, podaci

dobijeni analizom sekvenci više lokusa (engl. *multilocus sequence analysis*, MLSA) i sekvenciranjem celog genoma *B. cenocepacia* a posebno vrsta koje pripadaju taksonu K, kao i biohemijska sličnost, ukazuju da su se kod Bck bakterija odvojeni entiteti, koje sada zovemo vrstama, razvili relativno nedavno pa ne postoje uvek jasne granice među njima. Iz pragmatičnih razloga postoji potreba da se većina bakterijskih izolata klasifikuje u praktične jedinice/kategorije, ali redovno sretanje sa sojevima koji spadaju u intermedijarnu kategoriju, tj. ne mogu nedvosmisleno da se svrstaju u jednu od postojećih, ne bi trebalo smatrati problemom. Mogućnost da se ovakvi sojevi prepoznaju kao intermedijarni je važnija od nemogućnosti da se formalno svrstaju u jednu od postojećih kategorija.

Kod jedne od naših pacijentkinja identifikovana je *B. stabilis*. Kako je ova bakterija izolovana pri samo jednoj od ukupno dve posete Centru, nakon kojih je pacijentkinja izgubljena iz praćenja, ne može da se donese zaključak o dužini trajanja kolonizacije. Naš soj *B. stabilis* BCC149 je MLST analizom identifikovan kao ST857, i sličan je ST50 i ST52. *B. stabilis* je članica Bck koja se rede izoluje kod pacijenata sa CF, u proseku čini 1% izolata (Planet et Saiman, 2010). Sa nešto većom učestalošću je nađena u Slovačkoj 54% (Drevinek et al., 2003), Portugalu 18,2 % (Cunha et al., 2003), Italiji 6,3% (Campana et al., 2005), Argentini 5% (Martina et al., 2013). Osim iz sputuma pacijenata sa CF, *B. stabilis* sojevi su izolovani i iz krvi, respiratornih sekreta i briseva uha pacijenata koji ne boluju od ove bolesti i iz bolničke sredine (Vandamme et al., 2000).

Kod pacijenata hronično kolonizovanih Bck bakterijama obično se održava jedan soj, kao što je pokazano u prethodnim studijama (Mahenthiralingam et al., 1996). Tranzitorna koinfekcija sa više od jednog soja javlja se retko i verovatno ranije u toku Bck infekcije (Yang et al., 2006; Wellinghausen et Köthe, 2006). Neki sojevi genomovara III mogu da izazovu superinfekcije kod pacijenata već kolonizovanih drugim genomovarovima (Govan et al., 1993). Još u ranim studijama u kojima je vršena genotipizacija izolata iz serijski uzimanih sputuma opisana je pojava zamene soja koji je inicijalno izazvao infekciju novim, virulentnijim sojem što ima i klinički značaj jer su ovi drugi po pravilu udruženi sa kliničkim pogoršanjem i većim mortalitetom (Bernhardt et al., 2003). Govan i saradnici (1993) su opisali dva pacijenta, a Ledson i

saradnici (1998) pet pacijenata u svojim centrima kod kojih je inicijalni, originalni soj zamenjen epidemijskim *B. cenocepacia* sojem ET12, najverovatnije kao posledica unakrsnog prenosa infekcije sa drugog pacijenta. Kod većine ovih pacijenata je ubrzo došlo do brzog kliničkog pogoršanja. U studiji Mahenthiralingam i saradnika (2001), *B. cenocepacia* je zamenila prethodno dokazanu *B. multivorans* kod šest pacijenata; zamena *B. cenocepacia* drugom Bck vrstom nije opisana. Chen i saradnici (2001) su opisali dva pacijenta kod kojih su *B. vietnamiensis* i *B. gladioli* bile zamenjene epidemijskim sojem *B. cenocepacia* PHDC. U našem istraživanju, svi pacijenti su bili kolonizovani genetički srodnim sojevima tokom perioda istraživanja. Međutim, izolati iz perioda pre početka istraživanja, pre 2010. godine, nisu bili dostupni za analizu i postoji teorijska mogućnost da se takva promena ranije odigrala kod nekih pacijenata.

Kao odgovor na uočen epidemiološki trend naglog porasta incidencije i prevalencije Bck infekcija i kolonizacije u našem Centru, uveden je protokol parcijalne izolacije kako bi se sprečilo dalje širenje Bck među bolesnicima. Iako se u mnogim CF centrima primenjuje individualna segregacija pacijenata kao mera kontrole ovih infekcija (Saiman et al., 2003), ovu praksu za sada nije moguće primeniti u našem Centru zbog ograničenog prostora i nedovoljnih finansijskih sredstava, kao i organizacionih teškoća. Umesto prethodno ustanovljene prakse da bolesnici koriste zajedničku čekaonicu prilikom ambulantnih poseta, bolesnici sa Bck su premešteni u drugu čekaonicu i njihovi pregledi su zakazivani ili na kraju rada ili drugim danima u odnosu na bolesnike koji nisu kolonizovani. Na taj način je smanjena mogućnost da ove dve grupe bolesnika dođu u kontakt. Pored toga, opšte mere prevencije i kontrole infekcija tokom rada ambulante ali i na bolničkom odeljenju su pojačane, uključujući povećanu kontrolu higijene ruku i detaljno čišćenje bolničke sredine. Takođe, umesto usnika za spirometriju za višekratnu upotrebu koji su dezinfikovani i čija je zamena vršena između pacijenata, uvedena je upotreba usnika za spirometriju za jednokratnu upotrebu. Na bolničkom odeljenju, iako bolesnici sa CF i ranije nisu smešteni u iste sobe i pacijenti kolonizovani Bck bakterijama nisu imali direktan kontakt sa Bck-negativnim pacijentima, bilo je nemoguće sprečiti indirektan kontakt između ove dve grupe zbog neophodnosti korišćenja zajedničkog kupatila i toaleta. Kako jednokrevetne sobe sa kupatilom nisu dostupne na ovom odeljenju, određena su odvojena kupatila za

Bck-pozitivne i Bck-negativne pacijente kako bi se smanjila mogućnost da ove dve grupe dođu u kontakt.

Iako su mere parcijalne segregacije dovele do smanjenja incidencije, indirektno ukazujući da je interhumani prenos bio odgovoran za širenje infekcije, čini se da to nije bio jedini način prenosa Bck bakterija kod naših pacijenata. Pažnju zaslužuje činjenica da je kod 8 pacijenata (uzrasta 0,2–15,7 godina, medijana 4,4 godina) *B. cenocepacia* ST856 dokazana u respiratornim uzorcima uzetim na prvom pregledu u našem Centru. Nijedan od pacijenata nije prethodno bio u kontaktu sa drugim osobama obolelim od CF, mada su neki bili hospitalizovani u drugim zdravstvenim ustanovama van Beograda. Ovo ukazuje da, pored interhumanog prenosa, verovatno postoje i drugi načini nastanka kolonizacije, moguće iz spoljašnje sredine.

Sa tendencijom neprestanog porasta broja bolesnika sa CF koji se prate u Centru (broj je skoro dupliran u poslednjih deset godina), od velikog je značaja dalji rad na istraživanju izvora i načina prenosa Bck kako bi se preduzele najefikasnije mere prevencije. Potrebno je da se prostor unapredi kako bi bio primereniji važećim standardima nege ECFS (Conway et al., 2014). Nepostojanje jednokrevetnih soba sa kupatilima, kao i blizina ambulatnog i stacionarnog dela Centra povećavaju šansu da se bolesnici slučajno sretnu u različitim delovima bolnice (na primer, prilikom rendgenskih snimanja i slično) što umanjuje uspešnost mera kontrole i prevencije. Preporučeni standardi nege su dosta rigorozni i delom nedostižni za zemlje u razvoju, ali se kao prelazno rešenje preporučuje fazni pristup (Castellani et al., 2014).

Iako u poslednjoj godini istraživanja nije bilo novokolonizovanih bolesnika, postojeća visoka prevalencija će u narednim godinama predstavljati stalni rizik za širenje Bck. Značajno unapređenje bi bilo uvođenje metoda za detekciju Bck bakterija metodama koje se ne zasnivaju na mikrobiološkom kultivisanju, za ranu identifikaciju pacijenata koji su kolonizovani ali su im kulture još uvek negativne (direktna PCR detekcija Bck u respiratornim sekretima). Ovaj pristup se pokazao ključnim za rešavanje epidemija u drugim centrima (Dedeckova et al., 2012). U CF centru u Pragu, Češka, uvedena je primena PCR metode za detekciju *B. cenocepacia* ST32 direktno iz kliničkih uzoraka pacijenata jer je ST32 i dalje predominantan u ovom centru (Dedeckova et al.,

2013). U prošlosti, razvijene su PCR metode za detekciju više Bck sojeva kako bi se olakšala detekcija sojeva značajnih iz epidemioloških razloga, kao što su PCR za markere *cblA* (marker ET12 linije), BCESM (marker *B. cenocepacia* epidemijskih sojeva *recA* IIIA grupe) i IS1363 (marker za epidemijske sojeve ET12 i PHDC) (Dedeckova et al., 2013).

Potrebna je i stalna edukacija pacijenata i bolničkog osoblja. U studiji koja je ispitivala znanje i ponašanje odraslih pacijenata sa CF u jednom centru u Velikoj Britaniji utvrđeno je da, uprkos tome što je većina pacijenata (63,8%) dobila informacije o opasnostima kontakta sa drugim osobama sa CF, ispitanici nisu imali dobar uvid u rizik i kliničke posledice nastanka infekcije izazvane Bck bakterijama, epidemijskim sojevima *P. aeruginosa* ili MRSA. Pacijenti su dali srazmerno veći značaj MRSA a potcenili značaj Bck i *P. aeruginosa*. Čak 20–35% pacijenata je imalo kontakte sa drugim obolelim osobama, iako su priznali da njihov kvalitet života u socijalnom smislu ne bi bio umanjen ako bi takve kontakte izbegavali (Waine et al., 2007). Ipak, u istoj studiji, čak 35,1% pacijenata je izjavilo da nisu dobili savet o potrebi izbegavanja kontakta sa drugim osobama koje boluju od CF.

Jedan od segmenata ovog istraživanja je bilo i razmatranje nekih od faktora za koje se uobičajeno smatra da doprinose patogenom potencijalu. Ispitivani su prisustvo gena za određene faktore virulencije (*bcscV*, *fliG*, *wbiI*, *llpE*, *cepI* i *cepR*), sposobnost produkcije biofilma i osetljivost na antimikrobne lekove.

U našoj studiji, svih 14 izolata predstavnika različitih genotipova je bilo pozitivno na prisustvo gena *bcscV* koji učestvuje u biosintezi konzerviranog sekretornog sistema tipa III (T3SS). Brojni Gram-negativni bakterijski patogeni koriste T3SS da “isporuče” efektorske proteine, još neidentifikovane ali bitne za virulenciju, direktno u ćeliju domaćina (Tomich et al., 2003; O'Grady et Sokol, 2011). Parsons i saradnici (2001) su pokazali da su dva gena za T3SS (*bcscQ* i *bcscV*) prisutna kod svih članova Bck osim *B. cenocepacia* (genomovar I), i naši rezultati su u skladu sa ovim zapažanjima. Funkcija T3SS još nije precizno utvrđena, ali prisustvo takvih gena kod skoro svih članova Bck pokreće zanimljiva pitanja i definiše bitnu razliku između *B. cenocepacia* i drugih vrsta u okviru Bck.



Mutant *B. cenocepacia* J2315 bez *bcsvN* gena je pokazao smanjenu virulenciju u mišjem modelu infekcije, ukazujući na ulogu T3SS u patogenezi (Tomich et al., 2003).

Flagele Bck bakterija su odgovorne za pokretljivosti i adherenciju. Bck bakterije zadržavaju svoju pokretljivost tokom hronične infekcije, za razliku od *P. aeruginosa* (Drevinek et al., 2008). Međutim, prema rezultatima koje su dobili Kalferstova i saradnici (2015), analizom ekspresije gena Bck bakterija diseminiranih u toku “cepacia sindroma” uočene su značajne razlike na nivou transkriptoma među izogenim izolatima ST32 i one mogu da se pripišu stadijumu i lokalizaciji infekcije. U profilima globalne ekspresije gena izolata iz krvi u toku “cepacia sindroma” uočena je smanjena ekspresija flagelarnih gena. Nepokretni fenotip (evaluiran testom “swimming” motiliteta) je identifikovan kod izolata iz krvi šest od osam pacijenata sa “cepacia sindromom”; značajno je da je ovaj fenotip mogao da se dokaže i u izolatima iz respiratornog trakta čak do 24 meseca pre nastanka “cepacia sindroma”. Gubitak pokretljivosti nije uočen kod 89 izolata ST32 poreklom od 17 pacijenata sa hroničnom infekcijom ali bez “cepacia sindroma”. Autori smatraju da nalaz nepokretnog izolata *B. cenocepacia* može da služi kao znak upozorenja za mogući razvoj “cepacia sindroma” u bliskoj budućnosti. Ipak, ovakve podatke treba smatrati specifičnim za soj jer u nedavnoj studiji na velikom broju različitih sojeva *B. cenocepacia* poreklom od pacijenata sa CF nije ustanovljena korelacija između pokretljivosti i kliničkog ishoda infekcije, uprkos činjenici da je 38% testiranih izolata bilo nepokretno (Zlosnik et al., 2014). U našem istraživanju, svih 14 ispitivanih sojeva je bilo pozitivno na prisustvo *fliG* gena (dva izolata *B. cenocepacia* i jedan *B. stabilis*). Fenotipska ekspresija flagelarnog gena nije testirana u našoj studiji.

LPS, jedan od važnih faktora virulencije kod Bck i drugih Gram-negativnih bakterija, prisutan je u obilnoj količini u spoljašnjoj membrani bakterijske ćelije. LPS Bck bakterija ima snažnu endotoksičnu aktivnost i izaziva produkciju viših nivoa proinflamatornih citokina, kao što su faktor nekroze tumora, interleukin-6 i interleukin-8, nego LPS *P. aeruginosa* (AuCoin et al., 2010). Postoji značajna varijabilnost epitopa LPS između i u okviru različitih vrsta Bck bakterija, pa serotipizacija O-antigena ne može da se koristi za identifikaciju specifične vrste Bck. Jedan od gena za biosintezu LPS, *wbiI*, je sekvenciran kod većeg broja Bck izolata. Pokazano je da *wbiI* genotip ne

korelira sa vrstom Bck i da je konzerviran kod većine Bck izolata (Vinion-Dubiel et al., 2004). Do sličnog zapažanja smo došli u našoj studiji, svi testirani izolati predstavnici 14 genotipova, i *B. cenocepacia* i *B. stabilis*, bili su pozitivni na *wbiI*.

Efluks pumpe su opisane kod više bakterijskih vrsta u okviru Bck, a najbolje su proučene kod *B. cenocepacia*. Kad su eksprimirane, doprinose rezistenciji na izvesne antibiotike, uključujući aminoglikozide, hloramfenikol, trimetoprim, sulfametoksazol, fluorohinolone i tetracikline, ali i druga toksična jedinjenja (boje, deterdžente, dezinficijense i masne kiseline) (Nair et al., 2004). Kao i kod drugih nefermentujućih Gram-negativnih bacila, efluks pumpe iz familije RND (engl. *resistance nodulation cell division*) su najznačajnije kod Bck vrsta (Podnecky et al., 2015; Gugliera et al., 2006).

Kod *B. cenocepacia* je identifikovan efluks sistem nazvan CeoAB-OpcM ili RND-10, koji je odgovoran za rezistenciju na hloramfenikol, trimetoprim i ciprofloksacin. On pokazuje značajnu homologiju sa efluks sistemom MexEF/OprN kod *P. aeruginosa* (Nair et al., 2004; Podnecky et al., 2015). Odgovarajući inducibilni efluks operon sadrži pet gena (*ceoR*, *llpE*, *ceoA*, *ceoB* i *opcM*) i nazvan je *ceo* (engl. *cepacia efflux operon*) ili ceoAB-opcM. Samo kod *B. cenocepacia* izolata su nađene sve komponente *ceo* operona. Eksperimenti su pokazali da u prisustvu *ceo* operona dolazi do aktivnog efluksa hloramfenikola i salicilne kiseline, i da je on indukovano salicilatom i hloramfenikolom. CeoAB-OpcM efluks pumpa doprinosi virulenciji kod ljudi. Naime, salicilat je siderofora koja se veoma često sreće kod izolata Bck i prirodni je supstrat za CeoAB-OpcM efluks pumpu. Njegova sekrecija je stimulirana niskim koncentracijama gvožđa, pa sledi da su uslovi kakvi vladaju u CF plućima sami po sebi dovoljni da indukuju aktivaciju efluks pumpe i pojavu rezistencije kod izolata Bck, čak i bez prisustva selektivnog pritiska antibiotika (Nair et al., 2004). Interesantno je da neki *B. cenocepacia* sojevi koji sadrže samo dva ili tri gena iz *ceo* klastera, kao i sojevi drugih genomovara koji ne sadrže ovaj operon, imaju sposobnost sekrecije salicilata, pa verovatno da *ceo* efluks pumpa nije jedini mehanizam sekretovanja ove značajne siderofore (Nair et al., 2004).

Značajna razlika između CeoAB-OpcM pumpe i drugih prokariotskih efluks sistema je prisustvo *llpE* gena koji kodira protein sličan lipazi nazvan LlpE (engl. *lipase-like protein for efflux*). *llpE* gen nije opisan u drugim karakterisanim efluks operonima, niti postoji ekvivalent LlpE proteina kod drugih efluks pumpi. S obzirom da je *llpE* gen konzerviran kod većine sojeva koji sadrže ceoAB-OpcM operon i da se njegova transkripcija vrši istovremeno sa transkripcijom gena koji kodiraju strukturne komponente efluks pumpe, izgleda da ovaj gen predstavlja integralni deo operona (Nair et al., 2005). Velika strukturna sličnost LlpE proteina sa hidrolazama ukazuju na njegovu enzimsku funkciju i ulogu u adaptaciji i preživljavanju u plućima obolelih od CF (Nair et al., 2004). Amplifikacija PCR metodom i sekvenciranje *llpE* gena iz izolata Bck je pokazala da je sa najvećom učestalošću prisutan kod *B. cenocepacia*, ali je nađen i kod *B. cepacia* i *B. stabilis* (Nair et al., 2005). U našem istraživanju, PCR amplifikacijom je utvrđeno prisustvo *llpE* gena kod izolata koji pripadaju *B. cenocepacia* ST856 i *B. stabilis* ST857, što je u skladu sa rezultatima iz literature. Međutim, ovaj gen nije nađen kod izolata *B. cenocepacia* ST858 i ST859, što je donekle neobičan nalaz s obzirom na činjenicu da je ceoAB-OpcM operon bio prisutan kod većine do sada ispitivanih sojeva *B. cenocepacia*. Jedno od mogućih objašnjenja odnosi se na relativno delikatan taksonomski status ovih sojeva. Kao što je prethodno navedeno, ST858 i ST859 su analizom *recA* gena identifikovani kao *B. multivorans*, a MLST analizom kao *B. cenocepacia*.

Različite patogene bakterije koriste sisteme međućelijske komunikacije ili quorum-sensing sisteme za komunikaciju sa susednim ćelijama. Ovi sistemi omogućuju ćelijama da proizvode i primaju hemijske signale, što za rezultat ima promene u ekspresiji gena i promene u fenotipu koje doprinose patogenetskom procesu. Kod Gram-negativnih bakterija najviše je proučavan sistem koji podrazumeva produkciju AHL delovanjem sintaza iz LuxI familije proteina (Ryan et Dow, 2008). Tokom bakterijskog rasta, AHL se oslobađaju iz bakterijskih ćelija u okolinu. Kako raste gustina populacije bakterijskih ćelija, raste i koncentracija AHL, pa se dovoljan broj ovih molekula nađe unutar bakterijskih ćelija gde se reverzibilno vežu za odgovarajuće regulatore transkripcije koji su članovi LuxR familije proteina i dovode do promene njihove konformacije i aktiviranja regulatora transkripcije (Subramoni et Venturi, 2009). Bck bakterije

poseduju dva quorum-sensing sistema. CepIR sistem je prisutan kod svih vrsta u okviru Bck, dok je CciIR sistem prisutan samo kod sojeva *B. cenocepacia* koji sadrže ostrvo patogenosti *cci* koje se nalazi kod visokotransmisivnih sojeva ET12 klona (O'Grady et al., 2009). Funkcionalni značaj quorum-sensing sistema posredovanog AHL kod *B. cenocepacia* je naglašen činjenicom da se aktivnost AHL održava kod većine izolata iz sputuma kod hronično kolonizovanih pacijenata sa CF (McKeon et al., 2011). Između *B. cenocepacia* quorum-sensing sistema postoji kompleksan regulatorni odnos. Dok je CepIR pretežno pozitivni regulator transkripcije *cepI* i *cciIR* operona, CciR negativno reguliše njihovu ekspresiju. Globalni regulatori CepIR i CciIR kod *B. cenocepacia* kontrolišu aktivnost proteaze, lipaze i hitinaze, pokretljivost, produkciju siderofora, formiranje i sazrevanje biofilma, kao i ekspresiju gena koji kodiraju komponente efluks pumpi, pila, lektina i sekretornih sistema (Eberl, 2006; O'Grady et al., 2012). Kod 14 naših izolata predstavnika svih genotipova ispitali smo prisustvo *cepI* i *cepR* gena za AHL sintazu koji zajedno konstituišu CepIR sistem. Kod svih je dobijen pozitivan rezultat, što je u skladu sa podacima iz literature.

Biofilm predstavlja kompleksne, mnogoćelijske zajednice bakterija u kojima su zaštićene od delovanja antimikrobnih lekova i mehanizama imunske odbrane domaćina. Bakterije koje rastu u vidu biofilma izazivaju hronične infekcije sa perzistentnim zapaljenjem i oštećenjem tkiva, čije su odlike da (i) se održavaju uprkos primeni antibiotske terapije i delovanju urođenih i stečenih mehanizama imunske odbrane, i (ii) za razliku od kolonizacije, kod njih postoji imunski odgovor i kontinuirane patološke promene. Infekcije kod kojih stvaranje biofilma ima značajnu ulogu u patogenezi su endokarditis, hronična bronhopneumonija u sklopu cistične fibroze, perzistentni otitis media, hronični rinosinuzitis, hronični osteomijelitis i infekcije zglobnih proteza, infekcije vezane za prisustvo intravaskularnih katetera i stentova, i infekcije hroničnih rana (Høiby et al., 2010).

*B. cenocepacia* i druge Bck bakterije mogu da formiraju biofilm *in vivo* i *in vitro*, kolonizujući različite abiotičke površine kao što su staklo i plastika (Loutet et Valvano, 2010; Hoiby, 2002). To je kompleksan proces i pod kontrolom je brojnih sistema regulacije genske ekspresije, a na njega utiču i sinteza egzopolisaharida, pokretljivost, raspoloživost gvožđa i drugi faktori (Høiby, 2002). Formiranje biofilma doprinosi

perzistenciji Bck bakterija u plućima obolelih od CF. One mogu da formiraju i mešovite biofilmove sa *P. aeruginosa* u kojima međusobno komuniciraju preko quorum-sensing sistema. Poznato je da Bck bakterije koje rastu u vidu biofilma pokazuju značajno veću rezistenciju na antibiotike i dezinficijense, što ne samo da sužava mogućnosti lečenja već komplikuje i primenu efikasnih mera kontrole infekcija u bolnicama (Suppiger et al., 2013; Peeters et al., 2008). Rezistencija na antibiotike kod bakterija u biofilmu može da bude posledica sporog rasta, smanjene koncentracije kiseonika u bazi biofilma, onemogućene penetracije antibiotika usled vezivanja pozitivno naelektrisanih aminoglikozida za negativno naelektrisane polimere alginata, prisustva beta-laktamaza koje cepaju beta-laktamske antibiotike i preterane ekspresije efluks pumpi. Posledica je neuspeh antimikrobne terapije u eradikaciji bakterija u biofilmu, iako je primenjeni antibiotik pokazao efikasnost pri ispitivanju osetljivosti u laboratorijskim uslovima. Ipak, primena antibiotske terapije obično dovodi do privremenog kliničkog poboljšanja kod pacijenata (Høiby, 2002). Prema rezultatima do kojih je došlo više autora, najveću sposobnost produkcije biofilma *in vitro* pokazali su izolati *B. cenocepacia* i *B. multivorans*, dok je ova osobina bila manje izražena kod drugih vrsta u okviru Bck (Caraher et al., 2007; Conway et al., 2002; Savoia et Zucca, 2007).

U našem istraživanju analizirali smo sposobnost izolata Bck bakterija da produkuju biofilm *in vitro*. Većina izolata Bck (skoro 90%) pokazala je sposobnost produkcije biofilma, mada u različitoj meri. Najviše izolata je pokazalo umerenu sposobnost produkcije biofilma (74% od ukupnog broja izolata), a samo 3% izolata je produkovalo veliku količinu biofilma. S obzirom na činjenicu da je 98% izolata pripadalo vrsti *B. cenocepacia*, nismo mogli da poredimo kapacitet za produkciju biofilma među različitim vrstama Bck. Međutim, kako je stvaranje biofilma jedan od ključnih faktora koji doprinose hronicitetu Bck kolonizacije kod CF pacijenata, poredili smo sposobnost stvaranja biofilma kod izolata poreklom od hronično i izolata od tranzitorno kolonizovanih pacijenata i utvrdili da nije bilo statistički značajne razlike u produkciji biofilma između ove dve grupe izolata.

Mogućnosti lečenja infekcija izazvanih Bck bakterijama kod obolelih od CF su ograničene njihovom urođenom i stečenom rezistencijom na antimikrobne lekove. Multipla rezistencija Bck je posledica nepropustljivosti spoljašnje membrane, aktivnosti

efluks pumpi i produkcije inducibilnih hromozomskih beta-laktamaza. Urođena rezistencija na kolistin i polimiksin B se koristi i kao jedan od kriterijuma za identifikaciju Bck a ovi agensi ulaze i u sastav odgovarajućih selektivnih bakterioloških podloga (Nzula et al., 2002).

Za sada nema dovoljno dokaza na osnovu kojih bi mogao da se definiše optimalan terapijski režim za lečenje bolesnika sa CF hronično kolonizovanih Bck bakterijama (Horsley et al., 2011). Uglavnom se preporučuje da kliničari i dalje pristupaju svakom pacijentu individualno, uzimajući u obzir rezultate ispitivanja osetljivosti na antibiotike *in vitro*, prethodni klinički odgovor na terapiju i lično iskustvo. Evidentno je da postoji potreba za multicentričnim randomizovanim kliničkim studijama da bi se procenila efikasnost različitih terapijskih režima (Horsley et Jones, 2012). Piperacilin i ceftazidim su korišćeni za lečenje Bck infekcija kod pacijenata sa CF ali sa promenljivim uspehom i sa pojavom rezistencije tokom terapije (Pitt et al., 1996). Lewin i saradnici (1993) su pokazali da je meropenem bio među najaktivnijim antibioticima protiv Bck. Avgeri i saradnici (2009) su na osnovu analize rezultata osam relevantnih kohortnih studija, zaključili da je povoljan odgovor dobijen kod 68,4% do 100% pacijenata lečenih ceftazidimom i 66,7% pacijenata lečenih meropenemom. Takođe, 75% pacijenata je imalo poboljšanje nakon terapije piperacilinom, samim ili u kombinaciji sa drugim antimikrobnim agensima. Ipak, neophodno je dodatno kliničko iskustvo da bi se razjasnila adekvatnost ovih antibiotika za lečenje Bck infekcija.

Ispitivanje osetljivosti na antibiotike se uobičajeno koristi kao putokaz za izbor adekvatne antimikrobne terapije. Nažalost, kod Bck bakterija ni za jedan antimikrobni lek nema dovoljno dokaza o korelaciji između *in vitro* osetljivosti i kliničkog odgovora na terapiju. To je posledica potencijalnog neslaganja između *in vitro* i *in vivo* ekspresije rezistencije jer, kao što je pomenuto, Bck bakterije se u organizmu nalaze u obliku biofilma, a takođe mogu da vrše invaziju epitelnih ćelija disajnih puteva i makrofaga i da preživljavaju u njima intracelularno (Sajjan et al., 2006). Takođe, egzacerbacije respiratorne bolesti u sklopu CF se često leče kao polimikrobna infekcija, kombinacijom antibiotika, pa je skoro nemoguće napraviti korelaciju ishoda lečenja sa aktivnošću određenog antimikrobnog leka prema Bck. Iz navedenih razloga, lečenje bolesnika kolonizovanih Bck bakterijama je veoma težak zadatak. Iako savremeni terapijski

režimi uključuju kombinaciju dva ili tri antibiotika sa ciljem da se postigne baktericidni efekat, eradikacija Bck se retko postiže, posebno u slučaju hronične infekcije (Sousa, 2011; Horsley et al., 2011). Tako, pored primene naizgled adekvatne antimikrobne terapije, oko 60% pacijenata obuhvaćenih petogodišnjom studijom u velikom CF centru u Portugalu imalo je perzistentnu infekciju istim sojem Bck tokom perioda od 6 meseci do 4 godine (Leitão et al., 2008).

Zato, poslednjih godina postoji sve veća zabrinutost da konvencionalnim metodama ispitivanja osetljivosti kod pacijenata sa CF nedostaje klinička korisnost. Ova kontroverza ima korene i u zapažanjima da kod pacijenata koji imaju egzacerbaciju plućne infekcije izazvane Bck dolazi do kliničkog poboljšanja i nakon primene antibiotika na koje su njihovi patogeni rezistentni *in vitro* (na primer, tobramicina) a nema poboljšanja kada se leče antibioticima na koje su patogeni osetljivi *in vitro*. Jedno od mogućih objašnjenja je da se u ispitivanju osetljivosti koriste laboratorijski uslovi koji su bitno različiti od uslova koji vladaju u plućima osoba sa CF. U laboratoriji, bakterije se gaje planktonski u aerobnim uslovima i na obogaćenim hranljivim podlogama, dok u plućima obolelih one perzistiraju u vidu biofilma, u stacionarnoj fazi, i u sredini deficitarnoj nutrijentima. Postoji značajno interesovanje za korisnost ispitivanja osetljivosti na izolatima koji rastu u vidu biofilma ali klinička primenljivost takvih testova tek treba da bude dokazana (Planet et Saiman, 2010; Caraher et al., 2007). Utvrđeno je da MIK i minimalna baktericidna koncentracija (MBK) mogu da budu 100–1000 puta veće u starim biofilmovima u odnosu na ćelije koje rastu planktonski, dok su mladi biofilmovi manje “rezistentni”. Ako se bakterije iz biofilma oslobode i ponovo ispitaju, uočava se da njihova osetljivost postaje ista kao kod planktonskih bakterija (Høiby, 2002). Sa druge strane, studija Peeters i saradnika (2009) je pokazala malu razliku u rezistenciji između bakterija koje su rasle planktonski i bakterija u biofilmu prilikom testiranja aktivnosti ceftazidima, ciprofloksacina, meropenema, minociklina, tobramicina i trimetoprim/sulfametoksazola kod Bck sojeva.

Uticaj uslova kultivisanja pri ispitivanju osetljivosti Bck bakterija na nekoliko beta-laktamskih antibiotika ispitivali su i Corkill i saradnici (1994) i pokazali da je inkubiranje sojeva u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> smanjilo aktivnost piperacilin/tazobaktama i ceftazidima. Iako to nisu uslovi kultivisanja koji se koriste prilikom rutinskog

ispitivanja osetljivosti ovih mikroorganizama, oni su bliži uslovima koji postoje u plućima bolesnika sa CF i mogu da objasne pojavu da kod ova dva antibiotika *in vitro* osetljivost često nije praćena dobrim *in vivo* odgovorom na terapiju.

Jedno od zanimljivih pitanja je i ispitivanje sinergizma različitih antimikrobnih lekova pri izboru antibiotske terapije, ali do danas njegova uloga nije jasno definisana. Postoji samo jedna randomizovana kontrolisana studija koja je procenjivala kliničku efikasnost studija sinergizma u kojoj je jedna grupa pacijenata tokom plućne egzacerbacije lečena antibiotskom terapijom odabranom na osnovu MBK testiranih kombinacija antibiotika, a druga grupa je lečena na osnovu rezultata konvencionalnog ispitivanja osetljivosti (Aaron et al., 2005). Rezultati su pokazali da nije bilo razlike u vremenu do pojave sledeće plućne egzacerbacije ili u stepenu poboljšanja plućne funkcije između dve grupe ispitanika.

Tokom hroničnih infekcija u disajnim putevima obolelih od CF dolazi do pojave multiplih fenotipskih varijanti poreklom od iste klonalne populacije. Kada se ispituje osetljivost serijskih klonalnih izolata uočava se često postojanje različitih profila rezistencije. Različite fenotipske varijante nastaju usled genetičke adaptacije ili selektivnog pritiska različitih stresora u organizmu domaćina, posebno imunskih mehanizama, antibiotika, nedovoljne količine nutrijenata i kiseonika (Mira et al., 2011). St Denis i saradnici (2007) su opisali značajne razlike u osetljivosti na antibiotike serijskih izolata *B. cenocepacia* sakupljenih od 36 hronično inficiranih CF pacijenata tokom perioda istraživanja od 38 meseci. Izolati iz klinički stabilnih perioda su bili značajno osetljiviji na antibiotike u poređenju sa izolatima od istih pacijenata tokom egzacerbacija. Periodi agresivne antibiotske terapije mogu da izmene odnos osetljivih i rezistentnih varijanti što je rezultat adaptacije bakterija na promenljive uslove sredine, menjajući se u fenotip više ili manje rezistentan/tolerantan na antibiotike u uslovima prisustva ili odsustva antibiotika. Poznato je da se evolucioni uspeh bakterija zasniva na konstantnom menjanju stope mutacija što optimizuje njihovu sposobnost adaptacije na stalne promene uslova sredine (Leitão et al., 2008). Zanimljivo je da su zabeleženi i slučajevi da je prvi izolat kod pacijenta bio rezistentan na određeni antibiotik, a kasnije tokom hronične infekcije izolovane su i osetljive i rezistentne varijante istog klona. Dokazano je da migracija insercionih sekvenci u okviru Bck hromozoma može da utiče



na ekspresiju gena koji moduliraju rezistenciju na antibiotike. Regulacija posredovana ovim mehanizmom mogla bi da objasni i zašto izolati identičnog genotipa/pulsotipa a značajno različiti po svojoj osetljivosti na antibiotike mogu da se izoluju kod istog pacijenta (Pitt et al., 1996). Izvestan stepen akumuliranja rezistencije može da se objasni i tačkastim mutacijama, ali to ne izgleda kao verovatno objašnjenje kod većih razlika u rezistenciji koje obuhvataju više grupa antibiotika (Pitt et al., 1996). Izolacija bilo osetljivih ili rezistentnih varijanti tokom hronične plućne infekcije može da ukaže na heterogenost bakterijskih populacija soja sa istim genotipom koji su kolonizovali istog pacijenta.

Ispitivanjem osetljivosti na antimikrobne lekove naše kolekcije Bck izolata uočena je visoka učestalost rezistencije, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u drugim studijama (Mackenzie et al., 2004; Pitt et al., 1996; Zhou et al., 2007). Najefikasniji kao grupa su bili beta-laktamski antibiotici; meropenem i ceftazidim su imali najbolju inhibitornu aktivnost, sa 72,6% odnosno 71,6% osetljivih izolata. Od ne-beta-laktamskih antibiotika, minociklin je imao najbolju antimikrobnu aktivnost (40% osetljivih izolata). Određeni stepen aktivnosti pokazali su levofloksacin (36,8%) i hloramfenikol (22,1%). Svi ispitivani antibiotici su pokazali nešto manju aktivnost u grupi izolata poreklom od hronično kolonizovanih pacijenata. Zanimljivo je da su izolati *B. cenocepacia* ST856 bili uniformno rezistentni na trimetoprim/sulfametoksazol, koji se smatra jednim od lekova izbora u terapiji infekcija Bck bakterijama (Avgeri et al., 2009) i pokazao je dobru efikasnost u studijama izvesnih autora (Bonacorsi et al., 1999; Leitão et al., 2008). Izolati drugih ST-ova iz naše kolekcije su bili osetljivi na ovaj lek, ali prevaga klona ST856 uslovlila je visoku ukupnu učestalost rezistencije na trimetoprim/sulfametoksazol (95,8%). Uz veliki oprez, rezistencija na trimetoprim/sulfametoksazol kod Bck izolata u našem Centru može da se koristi kao grub, orijentacioni kriterijum za procenu da li je kod novokolonizovanih pacijenata izolovan epidemijski klon ST856, pre nego što se izvrši molekularna tipizacija.

Uzorci sputuma su češće uzimani kod pacijenata koji su imali klinička pogoršanja, a serijski izolati poreklom od hronično kolonizovanih pacijenata bili su uključeni u ispitivanje osetljivosti ako su smatrani fenotipski različitim. Od ukupno 95 izolata za koje su određivane MIK vrednosti, 75 je bilo od hronično kolonizovanih pacijenata

(n=34). Kod 19 pacijenata sačuvano je više od jednog izolata (2 do 9) koji su pripadali jednom ili više pulsotipova (najviše šest). Uprkos ponekad značajnim razlikama u profilima osetljivosti na antibiotike, oni su bili izogenični. Do sličnih rezultata došli su i drugi autori (Leitão et al., 2008).

Zapaženo je prisustvo velikog broja multirezistentnih izolata, što je u skladu sa studijama drugih istraživača (Leitão et al., 2008; MacKenzie et al., 2004). Izolacija multirezistentnih varijanti je češće bila udružena sa hroničnom infekcijom.

Naše istraživanje predstavlja prvi izveštaj o epidemiologiji Bck bakterija u regionu Balkanskog poluostrva. Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da su u periodu trajanja istraživanja u populaciji pacijenata sa CF u Srbiji Bck bakterije bile zastupljene sa visokom prevalencijom, kod oko 27% kolonizovanih osoba, a 18% je bilo hronično kolonizovanih. Na osnovu prethodnih iskustava, smatra se da ovako visoka prevalencija jednog klona mora da uključuje epidemijsko širenje. Identifikovan je jedan izrazito dominantan epidemijski klon *B. cenocepacia*, nazvan ST856, koji je genetički veoma srodan globalno rasprostranjenom klonu ST32 (CZ1).

Ova studija je ukazala na važne aspekte Bck infekcija u Centru za cističnu fibrozu u Beogradu i potrebu daljeg nadzora i unapređenja mera kontrole infekcija. Uvođenje skrininga uzoraka iz respiratornog trakta na Bck bakterije metodama molekularne biologije bi pomoglo u ranom otkrivanju kolonizovanih pacijenata i blagovremenu primenu odgovarajućih preventivnih mera.

## 6 ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

- Ukupna prevalencija Bck kolonizacije kod pacijenata sa CF lečenih u Centru za cističnu fibrozu Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ iznosila je 27,2% tokom četvorogodišnjeg perioda ispitivanja, dok je 18,5% pacijenata bilo hronično kolonizovano. Godišnja prevalencija iznosila je 17,6%–23,7%. Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da je prevalencija Bck kolonizacije u ispitivanoj populaciji pacijenata visoka u poređenju sa većinom drugih evropskih zemalja
- Genotipizacijom PFGE metodom identifikovano je 14 genotipova ali je genetička varijabilnost bila mala. Na osnovu srodnosti su grupisani u tri grupe, pri čemu je najbrojnija grupa obuhvatila čak 11 reprezentativnih pulsotipova
- Preliminarna molekularna identifikacija na osnovu umnožavanja gena za 16S rRNK PCR metodom i sekvenciranjem potvrdila je da svi izolati pripadaju Bck
- PCR metodom za amplifikaciju *recA* gena i naknadnim sekvenciranjem i filogenetskom analizom izolati su identifikovani kao tri Bck vrste, *B. cenocepacia* IIIA linije (izolovana kod 96% pacijenata), *B. multivorans* i *B. stabilis*
- MLST tipizacijom su identifikovane dve vrste, *B. cenocepacia* i *B. stabilis*, i četiri nova ST: *B. cenocepacia* ST856, ST858 i ST859, i *B. stabilis* ST857
- Dva soja, BCC267 i BCC269, su analizom *recA* gena identifikovana kao *B. multivorans*, a MLST analizom kao *B. cenocepacia*. Zbog ovog neslaganja urađena je filogenetska analiza konkatena sekvenci korišćenih u MLST koja je pokazala da neki sojevi koji su MLST metodom identifikovani kao *B. cenocepacia* zapravo mogu da budu *B. multivorans*. Ovaj rezultat ukazuje na kompleksnost identifikacije

Bck vrsta i činjenicu da između njih postoji genetički kontinuum zbog čega ih je nekada teško razlikovati

- Kod 96% kolonizovanih pacijenata dokazano je prisustvo istog soja, *B. cenocepacia* ST856, što ukazuje na prisustvo interhumanog načina prenosa
- Najzastupljeniji epidemijski soj *B. cenocepacia* ST856 je srodan globalno diseminovanom soju *B. cenocepacia* ST32
- Kod epidemijskog soja *B. cenocepacia* ST856 dokazano je prisustvo markera epidemijskih sojeva, *cblA* i BCESM, koji su do sada opisani samo kod malog broja visokotransmisivnih klonova
- Detekcijom gena koji determinišu faktore virulencije, kod ispitivanih sojeva potvrđeno je prisustvo faktora virulencije koji se standardno sreću kod Bck bakterija: quorum-sensing sistema, flagela, lipopolisaharida, efluks pumpe i sekretornog sistema tipa III
- Većina izolata u ovom istraživanju je produkovala biofilm, pri čemu nije ustanovljena statistički značajna razlika u sposobnosti produkcije biofilma između izolata poreklom od hronično kolonizovanih pacijenata i izolata tranzitorno kolonizovanih pacijenata
- Bck izolati su pokazali prisustvo visokog stepena rezistencije. Najbolju *in vitro* osetljivost Bck izolati su pokazali prema meropenemu (72,6%) i ceftazidimu (71,6%). Dominantni klon *B. cenocepacia* ST856 je bio rezistentan na trimetoprim/sulfametoksazol koji spada u lekove izbora za terapiju infekcija izazvanih Bck bakterijama

## 7 LITERATURA

- Aaron SD, Vandemheen KL, Ferris W, Fergusson D, Tullis E, Haase D, Berthiaume Y, Brown N, Wilcox P, Yozghatlian V, Bye P, Bell S, Chan F, Rose B, Jeanneret A, Stephenson A, Noseworthy M, Freitag A, Paterson N, Doucette S, Harbour C, Ruel M, MacDonald N (2005) Combination antibiotic susceptibility testing to treat exacerbations of cystic fibrosis associated with multiresistant bacteria: a randomised, double-blind, controlled clinical trial. *Lancet* 366:463–471.
- Agodi A, Mahenthiralingam E, Barchitta M, Gianninò V, Sciacca A, Stefani S (2001) *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: prevalence, epidemiology, and genomovar status. *J Clin Microbiol* 39:2891–2896.
- Avgeri SG, Matthaiou DK, Dimopoulos G, Grammatikos AP, Falagas ME (2009) Therapeutic options for *Burkholderia cepacia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review of the clinical evidence. *Int J Antimicrob Agents* 33:394–404.
- Baldwin A, Mahenthiralingam E, Drevinek P, Pope C, Waine DJ, Henry DA, Speert DP, Carter P, Vandamme P, LiPuma JJ, Dowson CG (2008) Elucidating global epidemiology of *Burkholderia multivorans* in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 46:290–295.
- Baldwin A, Mahenthiralingam E, Drevinek P, Vandamme P, Govan JR, Waine DJ, LiPuma JJ, Chiarini L, Dalmastrì C, Henry DA, Speert DP, Honeybourne D, Maiden MC, Dowson CG (2007) Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. *Emerg Infect Dis* 13:458–461.
- Baldwin A, Sokol PA, Parkhill J, Mahenthiralingam E (2004) The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both

virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun* 72:1537–1547.

Bernhardt SA, Spilker T, Coffey T, LiPuma JJ (2003) *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis: frequency of strain replacement during chronic infection. *Clin Infect Dis* 37:780–785.

Bittar F, Rolain JM (2010) Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 16:809–820.

Bonacorsi S, Fitoussi F, Lhopital S, Bingen E (1999) Comparative in vitro activities of meropenem, imipenem, temocillin, piperacillin, and ceftazidime in combination with tobramycin, rifampin, or ciprofloxacin against *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 43:213–217.

Boussaud V, Guillemain R, Grenet D, Coley N, Souilamas R, Bonnette P, Stern M (2008) Clinical outcome following lung transplantation in patients with cystic fibrosis colonised with *Burkholderia cepacia* complex: results from two French centres. *Thorax* 63:732–737.

Bressler AM, Kaye KS, LiPuma JJ, Alexander BD, Moore CM, Reller LB, Woods CW (2007) Risk factors for *Burkholderia cepacia* complex bacteremia among intensive care unit patients without cystic fibrosis: a case-control study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28:951–958.

Burns JL, Rolain JM (2014) Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: can we simplify the complexity? *J Cyst Fibros* 13:1–9.

Cantón R, del Campo R (2010) Cystic fibrosis: deciphering the complexity. *Clin Microbiol Infect* 16:793–797.

Caraher E, Reynolds G, Murphy P, McClean S, Callaghan M (2007) Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26:213–216.

- Carvalho AP, Ventura GM, Pereira CB, Leão RS, Folescu TW, Higa L, Teixeira LM, Plotkowski MC, Merquior VL, Albano RM, Marques EA (2007) *Burkholderia cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. ambifaria* and *B. vietnamiensis* isolates from cystic fibrosis patients have different profiles of exoenzyme production. *APMIS* 115:311–318.
- Castellani C, Conway S, Smyth AR, Stern M, Elborn JS (2014) Standards of care for cystic fibrosis ten years later. *J Cyst Fibros* 13(Suppl 1):S1–S2.
- Cazzola G, Amalfitano G, Tonolli E, Perazzoli C, Piacentini I, Mastella G (1996) *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* epidemiology in a cystic fibrosis population: a genome finger-printing study. *Acta Paediatr* 85:554–557.
- CFF (2014) Cystic fibrosis foundation patient registry 2013 annual data report. Bethesda, Maryland: Cystic Fibrosis Foundation
- CFC (2015) The Canadian cystic fibrosis registry 2013 annual report. Toronto, Ontario: Cystic Fibrosis Canada
- Chaparro C, Maurer J, Gutierrez C, Krajden M, Chan C, Winton T, Keshavjee S, Scavuzzo M, Tullis E, Hutcheon M, Kesten S (2001) Infection with *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: outcome following lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 163:43–48.
- Chen JS, Witzmann KA, Spilker T, Fink RJ, LiPuma JJ (2001) Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. *J Pediatr* 139:643–649.
- Chiarini L, Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Visca P (2006) *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends Microbiol* 14:277–286.

- Chiarini L, Cescutti P, Drigo L, Impallomeni G, Herasimenka Y, Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Manno G, Zanetti F, Rizzo R (2004) Exopolysaccharides produced by *Burkholderia cenocepacia* *recA* lineages IIIA and IIIB. *J Cyst Fibros* 3:165–172.
- Clode FE, Kaufmann ME, Malnick H, Pitt TL (2000) Distribution of genes encoding putative transmissibility factors among epidemic and nonepidemic strains of *Burkholderia cepacia* from cystic fibrosis patients in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 38:1763–1766.
- CLSI (2012) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI (2014) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coenye T, LiPuma JJ (2002) Multilocus restriction typing: a novel tool for studying global epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. *J Infect Dis* 185:1454–1462.
- Coenye T, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ (2002) Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* genomovar III. *J Clin Microbiol* 40:3300–3307.
- Coenye T, Spilker T, Van Schoor A, LiPuma JJ, Vandamme P (2004) Recovery of *Burkholderia cenocepacia* strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. *Thorax* 59:952–954.
- Conway BA, Venu V, Speert DP (2002) Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriol* 184:5678–5685.



- Conway S, Balfour-Lynn IM, De Rijcke K, Drevinek P, Foweraker J, Havermans T, Heijerman H, Lannefors L, Lindblad A, Macek M, Madge S, Moran M, Morrison L, Morton A, Noordhoek J, Sands D, Vertommen A, Peckham D (2014) European cystic fibrosis society standards of care: framework for the cystic fibrosis centre. *J Cyst Fibros* 13(Suppl 1):S3–S22.
- Corkill JE, Deveney J, Pratt J, Shears P, Smyth A, Heaf D, Hart CA (1994) Effect of pH and CO<sub>2</sub> on in vitro susceptibility of *Pseudomonas cepacia* to beta-lactams. *Pediatr Res* 35:299–302.
- Coutinho CP, Dos Santos SC, Madeira A, Mira NP, Moreira AS, Sá-Correia I (2011) Long-term colonization of the cystic fibrosis lung by *Burkholderia cepacia* complex bacteria: epidemiology, clonal variation, and genome-wide expression alterations. *Front Cell Infect Microbiol* 1:1–11.
- Cox AD, Wilkinson SG (1991) Ionizing groups in lipopolysaccharides of *Pseudomonas cepacia* in relation to antibiotic resistance. *Mol Microbiol* 5:641–646.
- Cunha MV, Leitão JH, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Lito L, Barreto C, Salgado MJ, Sá-Correia I (2003) Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a Portuguese cystic fibrosis center: a 7-year study. *J Clin Microbiol* 41:4113–4120.
- Dales L, Ferris W, Vandemheen K, Aaron SD (2009) Combination antibiotic susceptibility of biofilm-grown *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28:1275–1279.
- De Boeck K, Malfroot A, Van Schil L, Lebecque P, Knoop C, Govan JR, Doherty C, Laevens S, Vandamme P, Belgian *Burkholderia cepacia* Study Group (2004) Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex colonisation in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 23:851–856.

- Dedeckova K, Kalferstova L, Strnad H, Vavrova J, Drevinek P (2013) Novel diagnostic PCR assay for *Burkholderia cenocepacia* epidemic strain ST32 and its utility in monitoring infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 12:475–481.
- De Smet B, Mayo M, Peeters C, Zlosnik JE, Spilker T, Hird TJ, LiPuma JJ, Kidd TJ, Kaestli M, Ginther JL, Wagner DM, Keim P, Bell SC, Jacobs JA, Currie BJ, Vandamme P (2015) *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:2265–2271.
- De Soyza A, McDowell A, Archer L, Dark JH, Elborn SJ, Mahenthiralingam E, Gould K, Corris PA (2001) *Burkholderia cepacia* complex genomovars and pulmonary transplantation outcomes in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 358:1780–1781.
- De Soyza A, Morris K, McDowell A, Doherty C, Archer L, Perry J, Govan JR, Corris PA, Gould K (2004) Prevalence and clonality of *Burkholderia cepacia* complex genomovars in UK patients with cystic fibrosis referred for lung transplantation. *Thorax* 59:526–528.
- Drevinek P, Baldwin A, Lindenburg L, Joshi LT, Marchbank A, Vosahlikova S, Dowson CG, Mahenthiralingam E (2010) Oxidative stress of *Burkholderia cenocepacia* induces insertion sequence-mediated genomic rearrangements that interfere with macrorestriction-based genotyping. *J Clin Microbiol* 48:34–40.
- Drevinek P, Holden MT, Ge Z, Jones AM, Ketchell I, Gill RT, Mahenthiralingam E (2008) Gene expression changes linked to antimicrobial resistance, oxidative stress, iron depletion and retained motility are observed when *Burkholderia cenocepacia* grows in cystic fibrosis sputum. *BMC Infect Dis* 8:121.
- Drevinek P, Mahenthiralingam E (2010) *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect* 16:821–830.

- Drevínek P, Vosahliková S, Cínek O, Vavřová V, Bartošová J, Pohunek P, Mahenthiralingam E (2005) Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. *J Med Microbiol* 54:655–659.
- Duff AJ (2002) Psychological consequences of segregation resulting from chronic *Burkholderia cepacia* infection in adults with CF. *Thorax* 57:756–758.
- Eberl L (2006) Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. *Int J Med Microbiol* 296:103–110.
- Fehlberg LC, Andrade LH, Assis DM, Pereira RH, Gales AC, Marques EA (2013) Performance of MALDI-ToF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 77:126–128.
- Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Morosini MI, Lamas A, Máiz L, Cantón R (2012) MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 11:59–62.
- Foweraker J (2009) Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull* 89:93–110.
- Fung SK, Dick H, Devlin H, Tullis E (1998) Transmissibility and infection control implications of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis. *Can J Infect Dis* 9:177–182.
- Garske LA, Kidd TJ, Gan R, Bunting JP, Franks CA, Coulter C, Masel PJ, Bell SC (2004) Rifampicin and sodium fusidate reduces the frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation in adults with cystic fibrosis and chronic MRSA infection. *J Hosp Infect* 56:208–214.
- Goldstein R, Sun L, Jiang RZ, Sajjan U, Forstner JF, Campanelli C (1995) Structurally variant classes of pilus appendage fibers coexpressed from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *J Bacteriol* 177:1039–1052.

- Golini G, Cazzola G, Fontana R (2006) Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia*-complex isolates from an Italian cystic fibrosis centre. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25:175–180.
- Gotschlich A, Huber B, Geisenberger O, Togl A, Steidle A, Riedel K, Hill P, Tummler B, Vandamme P, Middleton B, Camara M, Williams P, Hardman A, Eberl L (2001) Synthesis of multiple N-acylhomoserine lactones is wide-spread among the members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Syst Appl Microbiol* 24:1–14.
- Govan JRW (2003) The *Burkholderia cepacia* complex and cytokine induction: an inflammatory tale. *Pediatr Res* 54:294–296.
- Govan JRW (2006) Other Gram-negative organisms. *Burkholderia cepacia* complex and *Stenotrophomonas maltophilia*. In: Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A (eds) *Cystic fibrosis in the 21st Century*, 1st edn. Karger, Basel, pp 145–152
- Govan JRW, Balendreau J, Vandamme P (2000) *Burkholderia cepacia* – friend and foe. *ASM News* 66:124–125.
- Govan JR, Brown AR, Jones AM (2007) Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol* 2:153–164.
- Govan JR, Brown PH, Maddison J, Doherty CJ, Nelson JW, Dodd M, Greening AP, Webb AK (1993) Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* 342:15–19.
- Govan JRW, Deretic V (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60:539–574.
- Graindorge A, Menard A, Neto M, Bouvet C, Miollan R, Gaillard S, de Montclos H, Laurent F, Cournoyer B (2010) Epidemiology and molecular characterization of a clone of *Burkholderia cenocepacia* responsible for nosocomial pulmonary tract infections in a French intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66:29–40.

- Hanulik V, Webber MA, Chroma M, Uvizl R, Holy O, Whitehead RN, Baugh S, Matouskova I, Kolar M (2013) An outbreak of *Burkholderia multivorans* beyond cystic fibrosis patients. *J Hosp Infect* 84:248–251.
- Harrison F (2007) Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 153:917–923.
- Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA (2011) Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis *Clin Microbiol Rev* 24:29–70.
- Heath DG, Hohneker K, Carriker C, Smith K, Routh J, LiPuma JJ, Aris RM, Weberand D, Gilligan PH (2000) Six-year molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates among cystic fibrosis patients at a referral center for lung transplantation. *J Clin Microbiol* 40:1188–1193.
- Hector A, Frey N, Hartl D (2016) Update on host-pathogen interactions in cystic fibrosis lung disease. *Mol Cell Pediatr* 3:12.
- Høiby N (2002) Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *J Cyst Fibros* 1:249–254.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35:322–332.
- Holmes A, Govan J, Goldstein R (1998) Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health? *Emerg Infect Dis* 4:221–227.
- Holmes A, Nolan R, Taylor R, Finley R, Riley M, Jiang RZ, Steinbach S, Goldstein R (1999) An epidemic of *Burkholderia cepacia* transmitted between patients with and without cystic fibrosis. *J Infect Dis* 179:1197–1205.
- Horsley A, Jones AM (2012) Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation. *Cochrane Database Syst Rev* 17;10:CD009529.

- Horsley A, Webb K, Bright-Thomas R, Govan J, Jones A (2011) Can early *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis be eradicated with antibiotic therapy? *Front Cell Infect Microbiol* 1:1–7.
- Humphreys H, Peckham D, Patel P, Knox A (1994) Airborne dissemination of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* from adult patients with cystic fibrosis. *Thorax* 49:1157–1159.
- Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, Levison H (1984) *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr* 104:206–210.
- Jolley KA, Maiden MC (2010) BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 11:595.
- Jones AM, Dodd ME, Govan JR, Barcus V, Doherty CJ, Morris J, Webb AK (2004) *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax* 59:948–951.
- Jovčić B, Begović J, Lozo J, Topisirović L, Kojić M (2009) Dynamic of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Arch Biol Sci* 61:159–165.
- Kim JM, Ahn Y, LiPuma JJ, Hussong D, Cerniglia CE (2015) Survival and susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex in chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42:905–913.
- Kiska DL, Riddell SW (2012a) Practical laboratory aspects of cystic fibrosis microbiology: an update, part I. *Clin Microbiol Newsl* 34:27–31.
- Kiska DL, Riddell SW (2012b) Practical laboratory aspects of cystic fibrosis microbiology: an update, part II. *Clin Microbiol Newsl* 34:35–41.

- Landers P, Kerr KG, Rowbotham TJ, Tipper JL, Keig PM, Ingham E, Denton M (2000) Survival and growth of *Burkholderia cepacia* within the free-living amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:121–123.
- Ledson MJ, Gallagher MJ, Corkill JE, Hart CA, Walshaw MJ (1998) Cross infection between cystic fibrosis patients colonised with *Burkholderia cepacia*. *Thorax* 53:432–436.
- Ledson MJ, Gallagher MJ, Jackson M, Hart CA, Walshaw MJ (2002) Outcome of *Burkholderia cepacia* colonisation in an adult cystic fibrosis centre. *Thorax* 57:142–145.
- Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM (2003) Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2:29–34.
- Lefebvre M, Valvano M (2001) In vitro resistance of *Burkholderia cepacia* complex isolates to reactive oxygen species in relation to catalase and superoxide dismutase production. *Microbiology* 147:97–109.
- Leitão JH, Sousa SA, Cunha MV, Salgado MJ, Melo-Cristino J, Barreto MC, Sá-Correia I (2008) Variation of the antimicrobial susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex clonal isolates obtained from chronically infected cystic fibrosis patients: a five-year survey in the major Portuguese treatment center. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:1101–1111.
- Leitão JH, Sousa SA, Ferreira AS, Ramos CG, Silva IN, Moreira LM (2010) Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:31–40.
- Lewin C, Doherty C, Govan J (1993) In vitro activities of meropenem, PD 127391, PD 131628, ceftazidime, chloramphenicol, co-trimoxazole, and ciprofloxacin against *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother* 37:123–125.

- LiPuma JJ (2007) Update on *Burkholderia* nomenclature and resistance. Clin Microbiol Newsl 29:65–69.
- LiPuma JJ (2010) The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 23:299–323.
- LiPuma JJ, Dase SE, Nielsol DW, Stern RC, Stull TL (1990) Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. Lancet 336:1094–1096.
- LiPuma JJ, Mortensen JE, Dasen SE, Edlind TD, Schidlow DV, Burns JL, Stull TL (1988) Ribotype analysis of *Pseudomonas cepacia* from cystic fibrosis treatment centers. J Pediatr 113:859–862.
- LiPuma JJ, Spilker T, Coenye T, Gonzalez CF (2002) An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. Lancet 359:2002–2003.
- LiPuma JJ, Spilker T, Gill LH, Campbell PW 3rd, Liu L, Mahenthiralingam E (2001) Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 164:92–96.
- Loutet SA, Valvano MA (2010) A decade of *Burkholderia cenocepacia* virulence determinant research. Infect Immun 78:4088–4100.
- Mackenzie FM, Smith SV, Milne KE, Griffiths K, Legge J, Gould IM (2004) Antibigrams of resistant Gram-negative bacteria from Scottish CF patients. J Cystic Fibrosis 3:151–157.
- Magalhães M, Doherty C, Govan JR, Vandamme P (2003) Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. J Hosp Infect 54:120–123.
- Mahenthiralingam E, Baldwin A, Dowson CG (2008) *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. J Appl Microbiol 104:1539–1551.



- Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, 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. *J Clin Microbiol* 38:3165–3173.
- Mahenthiralingam E, Campbell ME, Henry DA, Speert DP (1996) Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 34:2914–2920.
- Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB (2005) The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* 3:144–156.
- Mahenthiralingam E, Vandamme P, Campbell ME, Henry DA, Gravelle AM, Wong LT, Davidson AG, Wilcox PG, Nakielna B, Speert DP (2001) Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. *Clin Infect Dis* 33:1469–1475.
- Mann T, Ben-David D, Zlotkin A, Shachar D, Keller N, Toren A, Nagler A, Smollan G, Barzilai A, Rahav G (2010) An outbreak of *Burkholderia cenocepacia* bacteremia in immunocompromised oncology patients. *Infection* 38:187–194.
- Marolda CL, Hauröder B, John MA, Michel R, Valvano MA (1999) Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. *Microbiology* 145:1509–1517.
- Martina P, Bettioli M, Vescina C, Montanaro P, Mannino MC, Prieto CI, Vay C, Naumann D, Schmitt J, Yantorno O, Lagares A, Bosch A (2013) Genetic diversity of *Burkholderia contaminans* isolates from cystic fibrosis patients in Argentina. *J Clin Microbiol* 51:339–344.

- McClellan S, Callaghan M (2009) *Burkholderia cepacia* complex: epithelial cell-pathogen confrontations and potential for therapeutic intervention. *J Med Microbiol* 58:1–12.
- Medina-Pascual MJ, Valdezate S, Carrasco G, Villalón P, Garrido N, Saéz-Nieto JA (2015) Increase in isolation of *Burkholderia contaminans* from Spanish patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect* 21:150–156.
- Miller MB, Gilligan PH (2003) Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 41:4009–4015.
- Mira NP, Madeira A, Moreira AS, Coutinho CP, Sá-Correia I (2011) Genomic expression analysis reveals strategies of *Burkholderia cenocepacia* to adapt to cystic fibrosis patients' airways and antimicrobial therapy. *PLoS One* 6:e28831.
- Mohr CD, Tomich M, Herfst CA (2001) Cellular aspects of *Burkholderia cepacia* infection. *Microbes Infect* 3:425–435.
- Moura JA, Cristina de Assis M, Ventura GC, Saliba AM, Gonzaga L Jr, Si-Tahar M, Marques Ede A, Plotkowski MC (2008) Differential interaction of bacterial species from the *Burkholderia cepacia* complex with human airway epithelial cells. *Microbes Infect* 10:52–59.
- Nelson JW, Doherty CJ, Brown PH, Greening AP, Kaufmann ME, Govan JR (1991) *Pseudomonas cepacia* in inpatients with cystic fibrosis. *Lancet* 338:1525.
- Nørskov-Lauritsen N, Johansen HK, Fenger MG, Nielsen XC, Pressler T, Olesen HV, Høiby N (2010) Unusual distribution of *Burkholderia cepacia* complex species in Danish cystic fibrosis clinics may stem from restricted transmission between patients. *J Clin Microbiol* 48:2981–2983.
- Nzula S, Vandamme P, Govan JR (2000) Sensitivity of the *Burkholderia cepacia* complex and *Pseudomonas aeruginosa* to transducing bacteriophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 28:307–312.

- Nzula S, Vandamme P, Govan JR (2002) Influence of taxonomic status on the in vitro antimicrobial susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Antimicrob Chemother* 50:265–269.
- Papp-Wallace KM, Taracila MA, Gatta JA, Ohuchi N, Bonomo RA, Nukaga M (2013) Insights into  $\beta$ -lactamases from *Burkholderia* species, two phylogenetically related yet distinct resistance determinants. *J Biol Chem* 288:19090–19102.
- Parsons YN, Glendinning KJ, Thornton V, Hales BA, Hart CA, Winstanley C (2001) A putative type III secretion gene cluster is widely distributed in the *Burkholderia cepacia* complex but absent from genomovar I. *FEMS Microbiol Lett* 203:103–108.
- Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, LiPuma JJ, Coenye T, Weightman AJ, Jones TH, Mahenthiralingam E (2005) Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl Environ Microbiol* 71:3917–3927.
- Pegues DA, Carson LA, Tablan OC, FitzSimmons SC, Roman SB, Miller JM, Jarvis WR (1994) Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis. Summer Camp Study Group. *J Pediatr* 124:694–702.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T (2008) Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *J Hosp Infect* 70:361–368.
- Philippon A (2010) Beta-lactam resistance in other non-fermentative strict aerobic Gram-negative bacilli. In: Courvalin P, Leclercq R, Rice LB (eds.) *Antibiogram*. 2010 Eska Publishing, ASM Press, Portland, pp 175–211
- Pitt TL, Kaufmann ME, Patel PS, Bengtson LC, Gaskin S, Livermore DM (1996) Type characterisation and antibiotic susceptibility of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland. *J Med Microbiol* 44:203–210.

- Pitt TL, Simpson AJH (2006) *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. In: Gillespie SH, Hawkey PM (eds.) Principles and practice of clinical bacteriology. John Wiley & Sons, Chichester, pp 427–443
- Planet PJ, Saiman L (2010) Microbiology in cystic fibrosis. In: Allen JL, Panitch HB, Rubenstein RC (eds) Cystic fibrosis. Informa Healthcare, New York, pp 36–56
- Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Plésiat P, Nordmann P (2009) Naturally occurring class A beta-lactamases from the *Burkholderia cepacia* complex. Antimicrob Agents Chemother 53:876–882.
- Rabin HR, Surette MG (2012) The cystic fibrosis airway microbiome. Curr Opin Pulm Med 18:622–627.
- Radivojevic D, Sovtic A, Minic P, Grkovic S, Guc-Scekic M, Lalic T, Miskovic M (2013) Newborn screening for cystic fibrosis in Serbia: a pilot study. Pediatr Int 55:181–184.
- Ramsay KA, Butler CA, Paynter S, Ware RS, Kidd TJ, Wainwright CE, Bell SC (2013) Factors influencing acquisition of *Burkholderia cepacia* complex organisms in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 51:3975–3980.
- Ratjen F, Döring G (2003) Cystic fibrosis. Lancet 361:681–689.
- Reik R, Spilker T, LiPuma JJ (2005) Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. J Clin Microbiol 43:2926–2928.
- Richau JA, Leitão JH, Correia M, Lito L, Salgado MJ, Barreto C, Cescutti P, Sá-Correia I (2000) Molecular typing and exopolysaccharide biosynthesis of *Burkholderia cepacia* isolates from a Portuguese cystic fibrosis center. J Clin Microbiol 38:1651–1655.

- Saiman L, Siegel J, Cystic Fibrosis Foundation (2003) Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24(5 Suppl):S6–S52.
- Saiman L, Siegel JD, LiPuma JJ, Brown RF, Bryson EA, Chambers MJ, Downer VS, Fliege J, Hazle LA, Jain M, Marshall BC, O'Malley C, Pattee SR, Potter-Bynoe G, Reid S, Robinson KA, Sabadosa KA, Schmidt HJ, Tullis E, Webber J, Weber DJ; Cystic Fibrosis Foundation; Society for Healthcare Epidemiology of America (2014) Infection prevention and control guideline for cystic fibrosis: 2013 update. *Infect Control Hosp Epidemiol* 35(Suppl 1):S1–S67.
- Sajjan SU, Forstner JF (1992) Identification of the mucin-binding adhesin of *Pseudomonas cepacia* isolated from patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* 60:1434–1440.
- Sajjan U, Corey M, Humar A, Tullis E, Cutz E, Ackerley C, Forstner J (2001) Immunolocalisation of *Burkholderia cepacia* in the lungs of cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 50:535–546.
- Sajjan US, Yang JH, Hershenson MB, LiPuma JJ (2006) Intracellular trafficking and replication of *Burkholderia cenocepacia* in human cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Microbiol* 8:1456–1466.
- Savoia D, Zucca M (2007) Clinical and environmental *Burkholderia* strains: biofilm production and intracellular survival. *Curr Microbiol* 54:440–444.
- Segonds C, Bingen E, Couetdic G, Mathy S, Brahim N, Marty N, Plesiat P, Michel-Briand Y, Chabanon G (1997) Genotypic analysis of *Burkholderia cepacia* isolates from 13 French cystic fibrosis centers. *J Clin Microbiol* 35:2055–2060.
- Slinger R, Yan L, Myers R, Ramotar K, St Denis M, Aaron SD (2007) Pyrosequencing of a *recA* gene variable region for *Burkholderia cepacia* complex genomovar identification. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58:379–384.

- Smith DL, Gumery LB, Smith EG, Stableforth DE, Kaufmann ME, Pitt TL (1993) Epidemic of *Pseudomonas cepacia* in an adult cystic fibrosis unit: evidence of person-to-person transmission. *J Clin Microbiol* 31:3017–3022.
- Sokol PA, Sajjan U, Visser MB, Ginges S, Forstner J, Kooi C (2003) The CepIR quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. *Microbiology* 149:3649–3658.
- Song E, Jaishankar GB, Saleh H, Jithpratuck W, Sahni R, Krishnaswamy G (2011) Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications. *Clin Mol Allergy* 9:10.
- Sousa SA, Ramos CG, Leitão JH (2011) *Burkholderia cepacia* complex: emerging multihost pathogens equipped with a wide range of virulence factors and determinants. *Int J Microbiol* 2011:607575.
- Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthiralingam E (2002) Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis* 8:181–187.
- Spilker T, Baldwin A, Bumford A, Dowson CG, Mahenthiralingam E, LiPuma JJ (2009) Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. *J Clin Microbiol* 47:2607–2610.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 40:175–179.
- Suppiger A, Schmid N, Aguilar C, Pessi G, Eberl L (2013) Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Virulence* 4:400–409.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729.

- Tegos GP, Haynes MK, Schweizer HP (2012) Dissecting novel virulent determinants in the *Burkholderia cepacia* complex. *Virulence* 3:234–237.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233–2239.
- Thomassen MJ, Demko CA, Klinger JD, Stern RC (1985) *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis. A new opportunist. *Am Rev Respir Dis* 131:791–796.
- Tomich M, Mohr CD (2004) Transcriptional and posttranscriptional control of cable pilus gene expression in *Burkholderia cenocepacia*. *J Bacteriol* 186:1009–1020.
- Turton JF, O'Brien E, Megson B, Kaufmann ME, Pitt TL (2009) Strains of *Burkholderia cenocepacia* genomovar IIIA possessing the *cblA* gene that are distinct from ET12. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64:94–97.
- Vandamme P, Dawyndt P (2011) Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: past, present and future. *Syst Appl Microbiol* 34:87–95.
- Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kersters K, Govan JR (1997) Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:1188–1200.
- Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, Mahenthalingam E, Speert DP, 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. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:102–111.

- Vanlaere E, LiPuma JJ, 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. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1580–1590.
- Vial L, Chapalain A, Groleau MC, Déziel E. (2011) The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. *Environ Microbiol* 13:1–12.
- Vinion-Dubiel AD, Goldberg JB (2003) Lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex. *J Endotoxin Res* 9:201–213.
- Vinion-Dubiel AD, Spilker T, Dean CR, Monteil H, LiPuma JJ, Goldberg JB (2004) Correlation of *wbiI* genotype, serotype, and isolate source within species of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 42:4121–4126.
- Wellinghausen N, Köthe J (2006) Evidence of coinfection with distinct strains of *Burkholderia multivorans* in a cystic fibrosis patient. *Infection* 34:289–291.
- Wilkinson S, Pitt T (1995) *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: Surface chemistry and typing methods. *Rev Med Microbiol* 6:1–9.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* 36:1251–1275.
- Yang JH, Spilker T, LiPuma JJ (2006) Simultaneous coinfection by multiple strains during *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 54:95–98.



- Zhou J, Chen Y, Tabibi S, Alba L, Garber E, Saiman L (2007) Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1085–1088.
- Zlosnik JE, Hird TJ, Fraenkel MC, Moreira LM, Henry DA, Speert DP (2008) Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 46:1470–1473.
- Zolin A, McKone EF, van Rens J, Fox A, Iansa P, Preftitsi A, Gulmans V, Jung A, Mehta A, Viviani L, Vebert Olesen H; Contributing country managers and national representatives (2014) ECFSPR Annual Report 2010
- Zolin A, McKone EF, van Rens J, Fox A, Iansa P, Pypops U, Gulmans V, Jung A, Cosgriff R, Mehta A, Viviani L, Vebert Olesen H; Contributing country managers and national representatives (2016) ECFSPR Annual Report 2013

## SKRAĆENICE

AHL	N-acil-homoserin lakton
ATCC	Američka kolekcija kultura sojeva (engl. <i>American type culture collection</i> )
Bck	<i>Burkholderia cepacia</i> kompleks
bp	bazni parovi
CF	cistična fibroza
CLSI	Institut za kliničke i laboratorijske standarde (engl. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> )
CR3	receptor za komplement tip 3
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP	dezoksinukleotid-trifosfat
ECFS	Evropsko društvo za cističnu fibrozu (engl. <i>European Cystic Fibrosis Society</i> )
EDTA	etilen diamin tetrasirćetna kiselina
EGTA	etilen glikol tetrasirćetna kiselina
ENA	Evropska arhiva nukleotida (engl. <i>European Nucleotide Archive</i> )
EPS	egzopolisaharid
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IS	inerciona sekvenca
LB	Luria-Bertani
LlpE	protein sličan lipazi koji učestvuje u efluksu (engl. <i>lipase-like protein for efflux</i> )
LPS	lipopolisaharid
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight</i>

MBK	minimalna baktericidna koncentracija
Mbp	megabazni parovi
McF	McFarland
MHA	Mueller-Hinton agar
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MLSA	analiza sekvenci više lokusa (engl. <i>multilocus sequence analysis</i> )
MLST	tipizacija na osnovu sekvenci visoko konzerviranih lokusa (engl. <i>multilocus sequence typing</i> )
µm	mikrometar
MRSA	<i>S. aureus</i> rezistentan na meticilin (engl. <i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
NCBI	Nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl. <i>National Center for Biotechnological Information</i> )
OD	optička gustina (engl. <i>optical density</i> )
PCR	reakcija lančanog umnožavanja (engl. <i>polimerase chain reaction</i> )
PFGE	elektroforeza u pulsirajućem električnom polju (engl. <i>pulsed-field gel electrophoresis</i> )
PHDC	Philadelphia-District Columbia
pmol	pikomol
RAPD	nasumično umnožavanje polimorfne DNK (engl. <i>randomly amplified of polymorphic DNA</i> )
RNK	ribonukleinska kiselina
rpm	broj obrtaja u minuti (engl. <i>revolutions per minute</i> )
SDS	natrijum-dodecil-sulfat
ST	tip sekvence (engl. <i>sequence type</i> )
TBE	Tris/Borat/EDTA
TLR	receptor sličan Tollu (engl. <i>Toll-like receptor</i> )
T3SS	sekretorni sistem tipa 3
<i>Taq</i> polimeraza	termostabilna DNK polimeraza izolovana iz termofilne bakterije <i>Thermus aquaticus</i>
U	enzimska jedinica
V	volt

## BIOGRAFIJA

Zorica V. Vasiljević rođena je 24.3.1968. u Čupriji. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu završila je avgusta 1992. godine sa prosečnom ocenom 8,75. Pripravnički staž obavila je u KBC „Zemun“ i 1993. godine položila stručni ispit. U periodu od 1995. do 1997. godine radila je kao lekar na specijalizaciji u Laboratoriji za kliničku mikrobiologiju KBC „Zvezdara“, a od 1998. godine zaposlena je u Laboratoriji za kliničku mikrobiologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ u Beogradu.

Specijalistički ispit iz mikrobiologije sa parazitologijom položila je 1999. godine na Institutu za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Magistarsku tezu pod nazivom „Određivanje fenotipskih i genotipskih osobina sojeva *Pseudomonas aeruginosa* koji stvaraju metalo-beta-laktamaze“ odbranila je 2010. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Autor je i koautor 12 originalnih radova objavljenih in extenso u časopisima sa JCR liste i više radova koji su štampani u formi izvoda u zbornicima međunarodnih i nacionalnih naučnih skupova.

Govori engleski jezik.

**Prilog 1.**

## **Izjava o autorstvu**

Potpisana Zorica V. Vasiljević

Broj upisa \_\_\_\_\_

### **Izjavljujem**

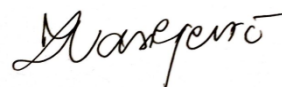
da je doktorska disertacija pod naslovom

**“Fenotipska i genotipska karakterizacija bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa izolovanih kod pacijenata sa cističnom fibrozom”**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 15.7.2016.

**Potpis doktoranda**



Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora     Zorica V. Vasiljević

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada     **“Fenotipska i genotipska karakterizacija bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa izolovanih kod pacijenata sa cističnom fibrozom”**

Mentor             Prof. dr Slobodanka Đukić

Komentor         Prof. dr Branko Jovčić

Potpisana             Zorica V. Vasiljević

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stanicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 15.7.2016.

**Potpis doktoranda**



### Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Svetozar Marković" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju po naslovom:

**"Fenotipska i genotipska karakterizacija bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa izolovanih kod pacijenata sa cističnom fibrozom"**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 15.7.2016.

**Potpis doktoranda**

