

Multigenska tipizacija izolata bakterija Burkholderia cepacia kompleksa

Drmić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:202024>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2023-03-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Martina Drmić

Multigenska tipizacija izolata bakterija
***Burkholderia cepacia* kompleksa**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Martina Drmić

**Multilocus sequence typing of *Burkholderia*
cepacia complex isolates**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

~ Zahvale ~

Prije svega se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Martini Šerugi Musić na predloženoj temi, stručnim savjetima i ukazanoj prilici da radim znanstveno istraživanje i kroz njega svladam nove vještine i steknem nova znanja. Doprinijeli ste lijepom završetku ovog životnog razdoblja.

Posebnu zahvalu dugujem prof. dr. sc. Jasni Hrenović na prikupljanju uzoraka, iznimnoj pristupačnosti i korisnim savjetima.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Branki Bedenić na kliničkom izolatu.

Zahvaljujem svojim dragim roditeljima na bezuvjetnoj potpori i podršci.

Vama dugujem ono što danas postajem i jesam!

Zahvaljujem sestrama Antoniji, Danijeli i Nini na svakoj toploj riječi i iskrenoj radosti nad svim mojim studentskim postignućima.

Zahvaljujem svom Lovri na divnoj potpori i vjeri u mene da ono što činim, činim najbolje.

Zahvaljujem svojim prijateljima i kolegama koji su olakšali slatke muke studiranja i nastanka ovog rada svojom potporom, motivacijom i vrijednim savjetima.

Psalam 119:105 - Tvoja riječ je svjetiljka na mojim nogama i svjetlo za moj put.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Multigenska tipizacija izolata bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa

Martina Drmić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Burkholderia cepacia kompleks skupina je Gram-negativnih nefermentirajućih bakterija koju čine 24 usko povezane vrste poznate kao autohtone bakterije u prirodnom okolišu, ali i kao uzročnici infekcija u imunokompromitiranih bolesnika. Budući da u Hrvatskoj do sada nema podataka o vrstama ovog kompleksa, cilj ovog diplomskog rada jest metodom molekularne identifikacije i multigenske tipizacije okarakterizirati sedam prethodno prikupljenih okolišnih izolata te jedan klinički izolat bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa kako bih ukazala na važnost poznavanja ovih vrsta koje se u okolišu brzo šire pod utjecajem odlaganja ljudskog i životinjskog otpada. Analizom sam obuhvatila gene za 16S rRNA, *lepA*, *atpD*, *gyrB*, *gltB*, *phaC*, *recA* i *trpB*. Prethodnu identifikaciju izolata kao potencijalnih *Burkholderia* spp. potvrdila sam molekularnom identifikacijom i filogenetskom analizom gena za 16S rRNA, a multigenskom tipizacijom odredila sam profile genotipova svih izolata. Rezultati analize pokazali su da se radi o vrstama *B. multivorans*, *B. cenocepacia* i *B. ambifaria*, a zabilježena je i pojava novih alela (genotipova) i profila ST (*sequence type*) ovih vrsta. Vrste *Burkholderia cepacia* kompleksa često su rezistentne na mnoge antibiotike stoga sam dokazala i mogući mehanizam rezistencije ovih izolata analizom fragmenta gena *bla*_{TEM} koji kodiraju β-laktamaze. Rana identifikacija vrsta ovog kompleksa iznimno je važna u sprječavanju prijenosa infekcija ovim bakterijama i ispravnog odabira antibiotika u njihovom liječenju.

(38 stranica, 14 slika, 11 tablica, 59 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Burkholderia cepacia* kompleks, identifikacija, genotipizacija, 16S rRNA, *bla*_{TEM}, filogenetska analiza.

Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić

Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Rad prihvaćen: 2. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Multilocus sequence typing of *Burkholderia cepacia* complex isolates

Martina Drmić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The *Burkholderia cepacia* complex is a group of Gram-negative non-fermenting bacteria encompassing 24 closely related species known as native bacteria in environment but also as cause of infection in immunocompromised patients. Since there is currently no data of this complex in Croatia, the aim of this study was the identification and multilocus sequence typing of seven previously collected environmental isolates and one clinical isolate of *Burkholderia cepacia* complex in order to indicate the importance of knowledge on these rapidly spreading species influenced by human and animal waste. The analysis included 16S rRNA, *lepA*, *atpD*, *gyrB*, *gltB*, *phaC*, *recA* and *trpB* genes. Predetermined identification of potential *Burkholderia* spp. isolates was confirmed by molecular identification and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene. The sequence types of isolates were determined by multilocus sequence typing. The results of the analysis revealed that isolates belong to *B. multivorans*, *B. cenocepacia* and *B. ambifaria* species. Moreover, new alleles (genotypes) and sequence types (ST) of these species were recorded. The species of *Burkholderia cepacia* complex are usually multiresistant to antibiotics and possible resistance mechanisms of these isolates by analysis of *bla*_{TEM} gene encoding β -lactamases were performed. Early identification of the *Burkholderia cepacia* complex species is extremely important in preventing the transmission of infection caused by these bacteria and the correct choice of antibiotics in their treatment.

(38 pages, 14 figures, 11 tables, 59 references, original in Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: *Burkholderia cepacia* complex, identification, genotyping, 16S rRNA, *bla*_{TEM}, phylogenetic analysis.

Supervisor: Assoc. Prof. Martina Šeruga Musić

Reviewers:

Assoc. Prof. Martina Šeruga Musić

Asst. Prof. Mirela Sertić Perić

Assoc. Prof. Vesna Petrović Peroković

Thesis accepted: 2. rujna 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. <i>Burkholderia cepacia</i> kompleks	1
1.2. Bakterije <i>Burkholderia cepacia</i> kompleksa kod pacijenata s cističnom fibrozom.....	2
1.3. Multigenška tipizacija (MLST)	3
1.4. Genom bakterija <i>Burkholderia cepacia</i> kompleksa	3
1.5. Rezistencija bakterija <i>Burkholderia cepacia</i> kompleksa.....	4
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	6
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. MATERIJALI.....	7
3.1.1. Bakterijski izolati	7
3.1.2. Mediji	8
3.1.3. Komercijalni kompleti.....	9
3.1.4. Početnice	9
3.1.5. Pribor i uređaji.....	11
3.1.6. Puferi i otopine	11
3.2. METODE.....	12
3.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	12
3.2.1.1. Umnažanje fragmenata bakterijskog gena za 16S rRNA	12
3.2.1.2. Umnažanje fragmenata bakterijskih gena u svrhu multigenške tipizacije.....	14
3.2.2. Elektroforeza u agaroznom gelu	15
3.2.3. Izolacija plazmidne DNA	17
3.2.3.1. Umnažanje gena <i>bla</i> _{TEM}	17
3.2.4. Sekvenciranje i analiza nukleotidnih slijedova	18
3.2.4.1. Uređivanje nukleotidnih slijedova dobivenih sekvenciranjem.....	18
3.2.4.2. Filogenetska analiza	19

3.2.4.3. Multigenska analiza (Multilocus sequence typing; MLST)	19
4. REZULTATI	20
4.1. Molekularna identifikacija analizom fragmenta gena za 16S rRNA.....	20
4.1.2. Umnažanje fragmenta gena za 16S rRNA	20
4.1.3. Filogenetska analiza gena za 16S rRNA	21
4.2. Analiza fragmenata MLST gena.....	22
4.2.1. Analiza umnoženih fragmenata gena elektroforezom.....	22
4.2.2. Rezultati multigenske tipizacije	26
4.3. Analiza fragmenata gena <i>bla</i> _{TEM}	28
5. RASPRAVA.....	30
6. ZAKLJUČAK.....	33
7. LITERATURA	34
8. ŽIVOTOPIS.....	38

KRATICE

BCC – *Burkholderia cepacia* kompleks

CF – cistična fibroza

MLST – eng. *Multilocus sequence typing*, multigenska tipizacija

ST – eng. *sequence type*, genotip

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

PCR – eng. *Polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

TBE-pufer – pufer Tris-a, borne kiseline i EDTA

lepA – eng. *Leader peptidase A*, elongacijski faktor 4

atpD – eng. *ATP synthase subunit beta gene*, gen za podjedinicu beta ATP-sintaze

gyrB – eng. *DNA gyrase subunit B gene*, gen za DNA-girazu

gltB – eng. *Glutamate synthase gene*, gen za glutamat-sintazu

phaC – eng. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase gene*, gen za polihidroksialkanoat-sintazu

recA – eng. *Recombinase A gene*, gen za rekombinazu A

trpB – eng. *Tryptophan synthase beta chain gene*, gen za triptofan-sintazu

*bla*_{TEM} – geni koji kodiraju za enzim β -laktamazu

ESBL – eng. Extended spectrum beta-lactamases, enzimi β -laktamaze proširenog spektra

1. UVOD

1.1. *Burkholderia cepacia* kompleks

Burkholderia cepacia (prvotno nazvana *Pseudomonas cepacia*) nekada se smatrala jednom bakterijskom vrstom, no danas je poznat cijeli kompleks ovih bakterija nazvan *Burkholderia cepacia* kompleks (BCC) koji trenutno čine 24 bakterijske vrste (Tavares i sur. 2020). Članove *Burkholderia cepacia* kompleksa prvi je put opisao Walter H. Burkholder 1950. godine kao biljne patogene koji uzrokuju trulež lukovice luka, a prirodno koloniziraju tlo. *Burkholderia cepacia* kompleks skupina je Gram-negativnih, nefermentirajućih proteobakterija koje su poznate kao autohtone bakterije u prirodnom okolišu. Riječ je o veoma varijabilnim organizmima koji zauzimaju iznenađujuće širok spektar ekoloških niša (Coenye i Vandamme 2003) što se pripisuje njihovoj genotipskoj i fenotipskoj plastičnosti, sposobnosti brzog mutiranja i prilagodbe na različite okolišne uvjete (Tavares i sur. 2020). Zbog svoje metaboličke raznolikosti i sposobnosti uspostavljanja uzajamnih i simbiotskih interakcija s biljkama, bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa koriste se za biološku kontrolu, poticanje rasta biljaka i bioremedijaciju, ali njihov patogeni potencijal sve je više zabrinjavajuć (Compant i sur. 2008). Iako prirodno borave u tlu, rizosferi (zoni tla uz korijen biljaka) i vodi (uključujući i morsku vodu) (Miller i sur. 2002, Coenye i Vandamme 2003), bakterije ovog kompleksa sve su češće izolirane iz dišnog sustava imunokompromitiranih bolesnika, posebice u iskašljaju bolesnika oboljelih od cistične fibroze (CF) (Abram i sur. 2007).

Primarni izvor zaraze ovim bakterijama jest prirodni okoliš, no odlaganje ljudskog i životinjskog otpada u okoliš pogoduje širenju klinički značajnih sojeva bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa. Pročišćavanje bolničkih i gradskih otpadnih voda, zabrana ilegalnog odlaganja čvrstog otpada i bakteriološka kontrola stajskog gnoja koji se koristi u poljoprivredi preporuča se za sprječavanje širenja zaraze. Bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa izazivaju sve veću javno-zdravstvenu zabrinutost koja se može kontrolirati jedino ranom identifikacijom i karakterizacijom vrsta ovog kompleksa, kao i proučavanjem mehanizama njihove rezistencije, promjenjivosti i prilagodljivosti.

1.2. Bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa kod pacijenata s cističnom fibrozom

Cistična fibroza (CF) nasljedna je bolest egzokrinih žlijezda opasna po život. Budući da žlijezde s egzokrinim izlučivanjem nisu u potpunosti funkcionalne, dolazi do redovitog nakupljanja gustog, ljepljivog sekreta na svim mjestima gdje ima žlijezda s vanjskim izlučivanjem, a obično se radi o dišnom sustavu, probavnom sustavu, reproduktivnom sustavu i žlijezdama znojnicama. Nakupljanje sluzi i sekreta pridonosi kroničnoj kolonizaciji i ponavljajućim infekcijama određenim patogenima među kojima su jedni od najčešćih bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa. Oštećenje respiratornog sustava uslijed kroničnih bakterijskih infekcija glavni je uzrok smrtnosti pacijenata oboljelih od CF (Vasiljević i sur. 2016).

Bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa pojavile su se kao problematični patogeni kod pacijenata oboljelih od cistične fibroze ranih 1970-tih godina (Henry i sur. 2001). Prvo značajno izvješće o infekciji bakterijom *Pseudomonas cepacia* zabilježili su Isles i sur. (1984), a za godinu dana Tablan i sur. (1985), potvrdivši da su infekcije tim bakterijama predstavljali velik problem u liječenju cistične fibroze. Bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa uspješno se prilagođavaju stresnim uvjetima koji karakteriziraju plućno okruženje pacijenata s cističnom fibrozom, što ih čini gotovo nemogućima za iskorijenjivanje, a to dovodi do nepredvidljivih ishoda, u rasponu od asimptomatskog širenja zaraze do neočekivanog pogoršanja pacijentovog stanja koje može kuliminirati smrtonosom nekrotizirajućom upalom pluća, otkazivanjem dišnog sustava i bakteremijom što je poznato kao "Cepacia sindrom" (Mahenthiralingam i sur. 2005). Unatoč tome, Hauser i Orsini (2015) zabilježili su slučajeve "Cepacia sindroma" i kod pacijenata koji ne boluju od cistične fibroze.

Vasiljević i sur. (2016) opisali su bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa kao važne oportunističke patogene među bolesnicima s CF zbog urođenih i stečenih otpornosti na više lijekova, velike sklonosti širenju između pacijenata unutar i izvan bolnice te nepredvidivog kliničkog ponašanja s brzim kliničkim pogoršanjem kod nekih bolesnika. Širenje kliničkih sojeva kod pacijenata s CF posljedica je izlaganja izvoru onečišćenja ili prijenosa s pacijenta na pacijenta. Najčešće kulture pronađene u izolatima bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa kod pacijenata s CF jesu *B. multivorans* i *B. cenocepacia* pri čemu je najviše smrtnih ishoda od "Cepacia sindroma" zabilježeno infekcijom *B. cenocepacia* (Jones i sur. 2004).

1.3. Multigenaska tipizacija (MLST)

Multigenaska tipizacija (MLST, eng. *multilocus sequence typing*) metoda je karakterizacije izolata bakterijskih vrsta gdje se analiziraju sekvence fragmenata najčešće sedam konstitutivnih (*housekeeping*) gena. Korištenje MLST-a kao metode genotipizacije unaprijedila je razumijevanje evolucije bakterija i pružila uvid u epidemiologiju bakterijskih bolesti. Prvotno, molekularna dijagnostika temeljila se isključivo na analizama 16S rRNA gena, no, iako se radi o vrlo konzerviranom genu, filogenetske analize ovog gena nisu dostatne za definiranje podskupina i razlikovanje sojeva unutar podskupina. Iz tog se razloga počinju koristiti manje konzervirani geni koji omogućuju preciznije razlikovanje blisko srodnih sojeva. Upotreba metode multigenске tipizacije prvi je put predložena 1998. godine (Maiden i sur. 1998). Metoda se najčešće izvodi na konstitutivnim genima iz razloga što sporije evoluiraju i tako pouzdanije pokazuju srodstvene odnose. No, u epidemiološke svrhe, metoda se najčešće izvodi spajanjem konstitutivnih i varijabilnih gena jer se tako dobije bolja klinička slika.

1.4. Genom bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa

Otkriće bakterija *Burkholderia cepacia* kao glavnih uzročnika infekcija kod pacijenata s cističnom fibrozom potaknulo je niz molekularnih istraživanja ove problematične bakterijske vrste. Nova taksonomska istraživanja pokazala su da je *Burkholderia cepacia* zapravo skup do sad otkrivene 24 genomski usko povezane bakterijske vrste koje su slične fenotipski, a različite filogenetski te su nazvane *Burkholderia cepacia* kompleks. Sve vrste ovog kompleksa sposobne su izazvati ozbiljne infekcije kod pacijenata sa CF kao i kod drugih imunokompromitiranih osoba, stoga je važno identificirati i naposljetku razlikovati sojeve ovih bakterija (Henry i sur. 2001). Sredinom 1990-tih identificirani su sojevi: *B. cepacia* (soj I), *B. multivorans* (soj II), *B. cenocepacia* (soj III), *B. stabilis* (soj IV), *B. vietnamiensis* (soj V) no nakon toga je utvrđena velika heterogenost među BCC bakterijama, što je dovelo do toga da je ovom kompleksu dodano još vrsta, poput *B. ambifaria* i *B. pyrrocinia* (Jin i sur. 2020). Prema Zhou i sur. (2020), mnogi geni ovih bakterija podložni su visokoj razini rekombinacije i pozitivnoj selekciji, a radi se uglavnom o genima koji sudjeluju u sintezi proteina i metabolizmu. Visoka razina rekombinacije između BCC vrsta zamagljuje njihove taksonomske granice, što dovodi do toga da ih je teško ili gotovo nemoguće razlikovati fenotipski i genotipski. Bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa imaju velik genom koji se sastoji od više

kružnih kromosomskih replikona koji sadrže dvostruko više genetičkog materijala od bakterije *E. coli*, veličine od 6,2 do 11,5 Mbp (Mannweiler i sur. 2021). Vrste ovog kompleksa često kodiraju multifunkcionalne gene što ih čini prilagodljivima na širok spektar okolišnih uvjeta, virulentnima i otpornima na lijekove (Zhou i sur. 2020). Sadrže primarni kromosom (C1) koji kodira gene za osnovne stanične funkcije, poput replikacije DNA, diobe stanice i transkripcije gena i sekundarni kromosom (C2) koji nosi manje konzervirane gene koji kao takvi igraju važnu ulogu u prilagodbi ovih bakterija na nove ekološke niše. Osim toga, članovi ovog kompleksa sadrže vrlo varijabilne dodatne replikone koji im pružaju jedinstvene metaboličke mogućnosti.

Prvotno, smatralo se da članovi *Burkholderia cepacia* kompleksa imaju tri kromosoma, no daljnja istraživanja pokazala su da je treći kromosom ustvari megaplazmid (pC3) koji ovim bakterijama pruža neka posebna svojstva, primjerice otpornost na neke toksine (Mannweiler i sur. 2021).

1.5. Rezistencija bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa

Prva linija obrane protiv antimikrobnih sredstava u vrstama *Burkholderia cepacia* kompleksa jest stanična membrana. Kao Gram-negativne bakterije, zbog tankog sloja peptidoglikana (mureina) u staničnoj stijenci, sadrže vanjsku ovojnici od lipopolisaharida, lipoproteina i fosfolipida. Lipopolisaharidi u toj ovojnici čine ove bakterije otpornima na polimiksin, a proteini porini zaslužni su za slabije prodiranje lijekova kroz staničnu membranu (Rhodes i Schweizer 2016). Osim toga, svi mikroorganizmi, pa tako i bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa sadrže “pumpe za ispuštanje” (eng. *efflux pumps*), kojima čiste stanicu od prodora antibiotika kroz staničnu membranu.

Općenito, tri vrste mehanizama omogućuju otpornost mikroorganizama na antibiotike. Prvi mehanizam jest intrinzična rezistencija, uzrokovana fizikalno-kemijskim svojstvima bakterija koje na izloženost antibioticima ne odgovaraju genetičkim promjenama. Primjer su spomenuti lipopolisaharidi i porini kod Gram-negativnih bakterija. Drugi mehanizam jest stečena otpornost koja se javlja mutacijom kromosoma, prijenosom gena za rezistenciju putem plazmida, transdukcijom (bakteriofagima) ili transformacijom, a također i mutacijom nekog regulatornog elementa, poput enzima ili pumpe za ispuštanje. Treći mehanizam kojim bakterije mogu postati rezistentne na antimikrobne lijekove jesu bakterijske prilagodbe na uvjete života, primjerice

planktonski rast umjesto stvaranja biofilma, unutarstanična anaerobioza ili spontano stvaranje stanica.

Iako je opće poznato da bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa kao ne-entero bakterije imaju tanju staničnu stijenku od entero bakterija poput *E. coli*, temeljni mehanizmi rezistencije ovih bakterija još nisu posve objašnjeni. Kao odrednice otpornosti ovih bakterija smatraju se promjene u membranskoj permeabilnosti i strukturi, primjerice, atipična lipopolisaharidna struktura (LPS) igra presudnu ulogu u unutarnjoj rezistenciji ovih bakterijskih vrsta na kationske peptide, osobito polimiksin B (Rhodes i Schweizer 2016). Osim toga, proteini porini u kombinaciji s enzimima odgovornima za rezistenciju i ekspresijom ispušnih pumpi također sudjeluju u rezistenciji ovih bakterija. Istraživanjem provedenom na nekoliko tisuća kliničkih izolata izoliranih kod bolesnika s CF utvrđena je rezistencija na mnoge standardne antibiotike koji se koriste u liječenju, pa je tako više od 50 % izolata pokazalo otpornost na kloramfenikol, kotrimoksazol, ciprofloksacin, tetraciklin, rifampin, avibaktam i ko-amoksiklav (Zhou i sur. 2007), stoga se za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijama *Burkholderia cepacia* kompleksa zasniva ponajviše na primjeni ceftazidima i drugih cefalosporina proširenog spektra djelovanja koji pripadaju skupini β -laktamskih antibiotika. No, neuspjeh u liječenju primjenom ceftazidima javlja se u približno 11-17 % kliničkih slučajeva. Rezistencija na β -laktamate povezana je s ekspresijom gena *bla*_{TEM} koji kodiraju za enzim β -laktamazu proširenog spektra na plazmidu bakterija. β -laktamaze grupirane su u četiri različite klase na temelju sličnosti u strukturi (klasa A, B, C i D). β -laktamaze klase A, C i D koriste serin kao nukleofil, dok su β -laktamaze klase B metaloenzimi, koristeći Zn^{2+} ione za katalitičke reakcije (Becka i sur. 2018). Za rezistenciju na ceftazidim odgovorna je β -laktamaza klase A kodirana genom *penA* smještenom na kromosomu 2 (C2) (Rhodes i Schweizer 2016). Nedavno istraživanje otkrilo je mutacije enzima za sintezu peptidoglikana, *AmpD* uzrokovane ceftazidimom što je pretpostavljeni uzrok pojačane regulacije PenB (klase B) i AmpC (klase C) β -laktamaze (Hwang i Kim 2015).

Daljna istraživanja mehanizama rezistencije bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa neophodna su za poboljšanje liječenja infekcija ovim bakterijama kod pacijenata s CF te drugih bolesnika s oslabljenim imunitetom. Višestruka otpornost na antibiotike, nedovoljno razjašnjeni mehanizmi otpornosti te brzo širenje bakterija ovog kompleksa predstavljaju sve ozbiljniji javno zdravstveni problem.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Budući da do sada u Hrvatskoj nema podataka o vrstama *Burkholderia cepacia* kompleksa, cilj ovog diplomskog rada bila je identifikacija i multigenska tipizacija okolišnih i jednog kliničkog izolata bakterija ovog kompleksa, kako bih ukazala na moguće širenje kliničkih sojeva ovih bakterijskih vrsta u okolišu (uslijed odlaganja ljudskog i životinjskog otpada), kao rezultat njihove prilagodljivosti, varijabilnosti i otpornosti te dokazati njihov mogući mehanizam rezistencije na β -laktamske antibiotike analizom fragmenta gena *bla*_{TEM}.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Bakterijski izolati

Od ukupno osam izolata bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa koje sam koristila za molekularnu analizu, sedam izolata prethodno je izdvojeno u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost br. IP-2014-09-5656 „Natural habitat of clinically important *Acinetobacter baumannii*“ i pohranjeno na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u Bakteriološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju Biološkog odsjeka PMF-a. Izolati su izdvojeni iz sljedećih uzoraka pod utjecajem otpada diljem Hrvatske: uzorak površinskog tla na ilegalnom odlagalištu otpada Lobarika 2 u Istri koji je sadržavao čvrsti otpad nepoznatog podrijetla (Hrenović i sur. 2019a); uzorak poljoprivrednog tla gnojenog svinjskim gnojem na dubini od 0 do 30 cm (Međimurje 1) i 30 do 60 cm (Međimurje 2) (Hrenović i sur. 2019a); uzorak poljoprivrednog tla tretiranog gnojem peradi na dubini od 30 do 60 cm (Međimurje 4) (Hrenović i sur. 2019a); uzorak sedimenta potoka nizvodno grada Zaboka u koji se ulijevaju nepročišćene gradske otpadne vode (Hrenović i sur. 2019b); uzorak vode rijeke Krapine nizvodno od ispuštanja nepročišćenih bolničkih otpadnih voda Opće bolnice Zabok (Hrenović i sur. 2019b) (Tablica 1).

Jedan klinički izolat bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa korišten za analizu dobiven je brisom rane (celulitis) 67-godišnjeg muškog pacijenta oboljelog od plazmocitoma na kirurškom bolničkom odjelu Opće bolnice Karlovac.

Svih sedam okolišnih i jedan klinički BCC izolat identificirani su prethodno pomoću MALDI-TOF MS (Microflex LT maseni spektrometar i MALDI Biotyper 3.0 softver, Bruker Daltonics, Njemačka) kao potencijalni pripadnici *Burkholderia* spp. (Hrenović i sur. 2021).

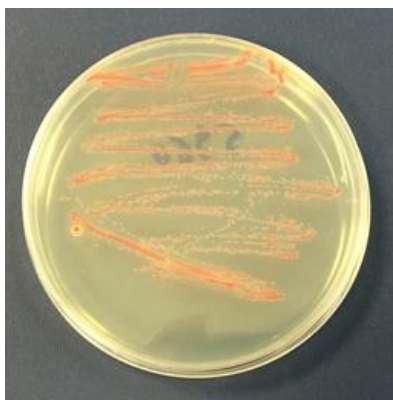
Tablica 1. Datum i mjesto prikupljanja uzoraka iz kojih su izdvojeni izolati bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa

Oznaka izolata	Datum prikupljanja	Mjesto prikupljanja
2/3	29.10.2016.	Tlo na odlagalištu otpada, Lobarika, Istra
2/4	29.10.2016.	Tlo na odlagalištu otpada, Lobarika, Istra
9/5	7.4.2017.	Sediment potoka, nizvodno grada Zaboka
9/6	7.4.2017.	Voda iz rijeke Krapine, nizvodno Opće bolnice Zabok
1/7	5.7.2017.	Poljoprivredno tlo gnojeno svinjskim gnojem, 30 cm
2/2	5.7.2017.	Poljoprivredno tlo gnojeno svinjskim gnojem, 60 cm
4/4	5.7.2017.	Poljoprivredno tlo gnojeno gnojem peradi
5964*	31.3.2020.	Bris rane, Opća bolnica Karlovac

*klinički izolat

3.1.2. Mediji

Izolati bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa selektirani su na selektivnoj kromogenoj hranjivoj podlozi CHROM agar Acinetobacter s dodatkom CR102 (CHROM agar) nakon inkubacije na temperaturi od 42 °C kroz 48 sati (Slika 1). Svaki od izolata kultiviran je naknadno na hranjivom mediju (Tryptic soy agar, Biolife) kao čista kultura pri 37 °C/24h kako kromogene komponente ne bi smetale prilikom molekularno bioloških analiza (Slika 2).



Slika 1. Klinički BCC izolat (5964)
na CHROM agar Acinetobacter



Slika 2. Okolišni BCC izolat (9/5)
na hranjivom mediju

3.1.3. Komercijalni kompleti

Za izolaciju plazmidne DNA koristila sam *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, SAD).

3.1.4. Početnice

Za identifikaciju izolata analizom gena 16S rRNA PCR amplifikacijom koristila sam početnice opisane od strane Vasiljević i sur. (2016):

Tablica 2. Slijed nukleotida početnica za umnažanje genske regije 16S rRNA bakterijskih izolata

Počelnica	Slijed nukleotida početnice
P1	5'-GAG AGT TTG ATC CTG GC-3'
P2	5'-AGG AGG TGA TCC AGC CG-3'

Nadalje, genotipove izolata (*sequence type*, ST) odredila sam kombinacijom genotipova sedam alela služeći se početnicama danim od strane Spilker i sur. (2009).

Tablica 3. Slijed nukleotida početnica za multigensku tipizaciju sedam lokusa vrsta *Burkholderia*

Gen	Slijed nukleotida početnica
<i>lepA</i>	5'-CTSATCATCGAYTCSTGGTTCGC-3'
	5'-GRTATTCCTTGAACCTCGTARTCC-3'
<i>atpD</i>	5'-ATGAGTACTRCTGCTTTGGTAGAA-3'
	5'-GGCGTGAAACGGTAGATGTTGTCG-3'
<i>gyrB</i>	5'-ACCGGTCTGCAYCACCTCGTYT-3'
	5'-CGTTGWARCTGTCGTTCCACTGC-3'
<i>gltB</i>	5'-CTGCATCATGATGCGCAAGTG-3'
	5'-CTTGCCGCGGAARTCGTTGG-3'
<i>phaC</i>	5'-GCACSAGYATYTGCCAGCGC-3'
	5'-CATSTCSGTRCCRATGTAGCC-3'
<i>recA</i>	5'-AGGACGATTCATGGAAGAWAGC-3'
	5'-GACGCACYGAYGMRTAGAACTT-3'
<i>trpB</i>	5'-CGCGYTTCCGGVATGGARTG-3'
	5'-ACSGTRTGCATGTCCTTGTCG-3'

Neke od početnica korištene pri umnažanju fragmenata gena *bla_{TEM}* opisane su od strane Arlet i sur. (1995):

Tablica 4. Slijed nukleotida početnica za umnažanje fragmenata gena *bla_{TEM}* bakterijskih izolata

Početnica	Slijed nukleotida početnice
OT3	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3'
OT4	5'-CCAATGCTTAATCAGTGAGG-3'

3.1.5. Pribor i uređaji

Prilikom izrade ovog diplomskog rada služila sam se sljedećim priborom i uređajima:

- mikropipete: Biohit, Finska
Eppendorf, Njemačka
CAPP, Danska
- mikroeprovete i nastavci: Eppendorf, Njemačka
- vaga: Precisa 62 A (Precisa Instruments AG, Švicarska)
- centrifuge: Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Njemačka)
- vrtložne miješalice (vorteksi): EV-100 (Tehtnica Železniki, Slovenija) Bio Vortex VI (Kisker-Biotech, Njemačka)
- spektrofotometar: Nanodrop 2000 (Thermo scientific, SAD)
- PCR uređaji: SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD)
- kadice za elektroforezu: Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, SAD)
- uređaj za napajanje za elektroforezu: Power Pac 300 (Bio-Rad, SAD)
- sustav za dokumentaciju gelova: DigiGenius (Syngene Ltd., UK)
- digitalni fotoaparat: Panasonic DMC-FZ8 (Panasonic, Japan)

3.1.6. Pufferi i otopine

- TE-pufer, pH 7,6
- GoTaq® Colorless Master Mix, 2X (400 μ M dATP; 400 μ M dGTP; 400 μ M dCTP; 400 μ M dTTP; 3 mM MgCl₂) (Promega, SAD)
- 0,5X TBE-pufer za elektroforezu (0,9 M Tris-Borate, 2 mmol EDTA)
- Fluorescirajuća boja SYBR™ Safe DNA Gel Stain (ThermoFisher Scientific, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom ili PCR (eng. *polymerase chain reaction*) metoda je kojom se relativno kratki dio molekule DNA umnožava u veliki broj identičnih kopija. Godine 1983. Kary Mullis otkrio je i opisao metodu kojom se *in vitro* umnožava molekula DNA bez kloniranja i to iz malih količina DNA. Ova vrlo jednostavna metoda pokrenula je pravu revoluciju u molekularnoj biologiji, a danas se koristi u razvoju dijagnostičkih testova u mikrobiologiji, virologiji, dijagnostici nasljednih i malignih bolesti, izboru “pametnih” lijekova, u praćenju terapija i odgovora na terapiju, te u forenzičkim i identifikacijskim dokazivanjima.

Ono na čemu se ova metoda zasniva jest da se mali, ciljni dio molekule DNA koji se želi umnožiti određuje kratkim oligonukleotidnim sekvencama – početnicama (eng. *primers*) koji su komplementarni krajevima dijela DNA od interesa. Početnice služe kao početak lanca za sintezu novih, identičnih lanaca molekule DNA lancima koje želimo umnožiti, a koji služe kao kalup. Sinteza na početnicama započinje dodatkom enzima DNA polimeraze, a veličinu sintetiziranog dijela DNA molekule odgovara dužini koju omeđuju primeri.

PCR reakcija sastoji se od 30-tak identičnih ciklusa pri čemu je na kraju svakog ciklusa umnožavanja broj molekula DNA udvostručen u odnosu na prethodni ciklus (eksponencijalno umnožavanje). Svaki se ciklus sastoji od tri uzastopna koraka koji se ciklički ponavljaju i definirani su određenom temperaturom i duljinom trajanja. Prvi je korak denaturacija komplementarnih lanaca DNA kalupa pri čemu je temperatura oko 95 °C. Drugi korak jest prijanjanje oligonukleotidnih početnica na DNA kalup (svaka se početnica veže na samo jedan lanac DNA kalupa) pri čemu se temperature spušta na 50-60 °C i treći korak je sinteza novih, komplementarnih lanaca DNA polimerazom pri temperature oko 72 °C. Nakon sinteze ponovno započinje denaturacija i proces se ponavlja željeni broj ciklusa (Pavlica i sur. 2013).

3.2.1.1. Umnažanje fragmenata bakterijskog gena za 16S rRNA

Svih sedam okolišnih i jedan klinički izolat identificirani su prethodno pomoću MALDI-TOF MS (Microflex LT maseni spektrometar i MALDI Biotyper 3.0 softver, Bruker Daltonics, Njemačka)

kao potencijalni pripadnici *Burkholderia* spp. (Hrenović i sur. 2021). Kako bih preciznije odredila vrste kojima prikupljeni izolati pripadaju, podvrgnula sam ih molekularnoj identifikaciji pri čemu je prvi korak lančana reakcija polimerazom kako bih umnožila fragmente gena za 16S rRNA navedenih izolata. Prvotno, kolonije svih uzoraka suspendirala sam u 1 mL vode te inkubirala 10 min pri 98 °C od čega sam volumen od 2 µL koristila kao kalup za PCR. Specifičnim umnažanjem bakterijskog gena za 16S rRNA PCR metodom, dokazala sam prisutnost bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa u odabranim uzorcima, te sekvenciranjem odredila vrste unutar ovog kompleksa kojima prikupljeni izolati pripadaju.

Tablica 5. Reakcijska smjesa po uzorku za lančanu reakciju polimeraze korištena za umnažanje gena za 16S rRNA.

Reagens	Volumen za PCR / µL
Sterilna dH ₂ O	9,5
Matična smjesa 2x (0,4 mM dATP; 0,4 mM dGTP; 0,4 mM dCTP; 0,4 mM dTTP i 3 mM MgCl ₂)	12,5
Kalup	1
P1 (5 µM)	1
P2 (5 µM)	1

Uvjeti umnažanja u PCR-u bili su: početna denaturacija pri 96 °C na 5 minuta (1 ciklus); denaturacija pri 96 °C, 30 sekundi (30 ciklusa); prijanjanje početnica na kalup pri 55 °C, 30 sekundi (30 ciklusa); sinteza komplementarnih lanaca DNA produljivanje pri 72 °C, 30 sekundi (30 ciklusa) te završno produljivanje lanaca DNA pri 72 °C, 5 minuta (1 ciklus).

Kao pozitivne kontrole u lančanim reakcijama polimerazom koristila sam DNA reprezentativnih uzoraka, a kao negativnu kontrolu vodu.

Metodu lančanu reakciju polimerazom izvela sam služeći se uređajem ProFlex™ 96 Well PCR System, Applied Biosystems, USA.

3.2.1.2. Umnažanje fragmenata bakterijskih gena u svrhu multigenске tipizacije

Uz identifikaciju izolata analizom konzerviranog gena za 16S rRNA, napravila sam analizu sedam konstitutivnih gena svih izolata kako bih razlikovala sojeve vrsta. Analizirala sam gene *lepA*, *atpD*, *gyrB*, *gltB*, *phaC*, *recA* i *trpB* kako bih odredila genotipove (*sequence type*) svakog pojedinog soja.

Tablica 6. Reakcijska smjesa po uzorku za lančanu reakciju polimeraze korištena za umnažanje fragmenata gena u svrhu multigenске tipizacije

Reagens	Volumen za PCR / μL
Sterilna dH ₂ O	9,5
Matična smjesa 2x (0,4 mM dATP; 0,4 mM dGTP; 0,4 mM dCTP; 0,4 mM dTTP i 3 mM MgCl ₂)	12,5
Kalup	1
Početnica <i>f</i> (5 μM)	1
Početnica <i>r</i> (5 μM)	1

Uvjeti umnažanja za fragmente bakterijskih gena u svrhu multigenске tipizacije u PCR-u bili su: početna denaturacija pri 95 °C, 2 minute (1 ciklus); denaturacija pri 94 °C, 30 sekundi (30 ciklusa); prijanjanje početnica na kalup pri odgovarajućoj temperaturi prema Tablici 6, 30 sekundi (30

ciklusa); sinteza komplementarnih lanaca DNA produljivanje pri 72 °C, 1 minuta (30 ciklusa) te završno produljivanje lanaca DNA pri 72 °C, 5 minuta (1 ciklus).

Tablica 7. Temperatura prijanjanja za amplifikaciju i sekvenciranje sedam MLST lokusa bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa

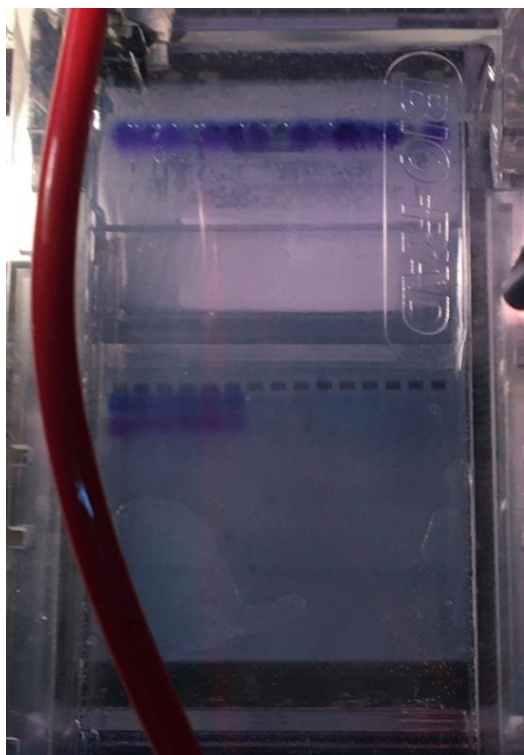
Gen	Temperatura prijanjanja u PCR-u / °C
<i>atpD</i>	56
<i>gltB</i>	58
<i>gyrB</i>	60
<i>lepA</i>	55
<i>phaC</i>	58
<i>recA</i>	58
<i>trpB</i>	58

3.2.2. Elektroforeza u agaroznom gelu

Za provjeru uspješnosti umnažanja molekula DNA nakon lančane reakcije polimerazom, napravila sam elektroforezu u 1 %-tnom agaroznom gelu. Priredila sam 1 %-tni gel agaroze dodatkom 35 mL 0,5x TBE pufera (Tris-Borat EDTA) u 350 mg agaroze. Otapanje agaroze pospješila sam zagrijavanjem navedene smjese tri puta do vrenja u staklenoj tikvici u mikrovalnoj pećnici. Nakon hlađenja tikvice pod vodom na sobnu temperaturu, u smjesu sam dodala 0,7 µL SYBR™ Safe DNA Gel Stain boje. Obojani gel potom sam izlila u prethodno pripremljen kalup za gel i ostavila

da polimerizira tijekom dvadesetak minuta. Zatim, kalup s gelom premjestila sam u kadnicu za elektroforezu „Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, SAD)“ i prelila kadnicu do vrha s TBE puferom. U jažice gela nanijela sam po 5 μL PCR-produkta pomiješanog s 1 μL obojenog pufera za nanošenje laganim uvlačenjem i ispuštanjem cijelog sadržaja na parafilmu, a u prvu jažicu gela nanijela sam 8 μL 1kb molekularnog markera pomiješanog s 1 μL obojenog pufera, radi kontrole duljine amplikona. Elektroforeza se provodila 20 min pri konstantnom naponu od 150 V („Powerpac 300“, Bio-Rad, SAD).

Dobivene rezultate promatrala sam na UV-transiluminatoru, fotografirala i dokumentirala sustavom za dokumentaciju DigiGenius (Syngen, Ltd., UK) te obradila programom GIMP 2 (The GIMP Development Team, 2019. *GIMP*, <https://www.gimp.org>) za obradu fotografija.



Slika 3. Elektroforeza u 1 %-tnom agaroznom gelu

3.2.3. Izolacija plazmidne DNA

Za određivanje lokacije gena *bla*_{TEM} PCR metodom izolirala sam i umnožila i genomsku i plazmidnu DNA kako bih otkrila koja DNA nosi odgovornost mehanizma rezistencije na antibiotike izolata bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa.

Izolaciju plazmidne DNA radila sam koristeći PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, SAD) dok sam kao kalup za genomsku DNA koristila bakterijsku suspenziju inkubiranu na 98 °C, kako je prethodno opisano. Izolacijom plazmida Miniprep-metodom može se izolirati visoko kvalitetna plazmidna DNA (i do 30 µg), a sam postupak traje 30-45 minuta. U ovom dijelu koristila sam postupak izolacije plazmidne DNA centrifugiranjem. Prvotno sam 2,5 µL svih osam uzoraka (uključujući i vodu) podvrgnula centrifugiranju 10 minuta na 6000 rpm (rotacija/okretaja po minuti) kako bi se stanice istaložile, potom sam uklonila supernatant. Dodala sam zatim 250 µL pufera s RNazom A za resuspenziju i resuspendirala talog dok ne postane homogen nakon čega sam dodala 250 µL pufera za lizu stanica i promiješala sadržaj okretanjem epice više puta polako za 180°. Inkubirala sam uzorke na sobnoj temperature pet minuta, a potom dodala 350 µL taložnog pufera i ponovno okretala epice do homogenizacije. Dobiveni sadržaj centrifugirala sam 10 minuta na 12 000 rpm a dobiveni supernatant sam prebacila u nove epice. Dobivenom supernatantu dodala sam 500 µL pufera za ispiranje s etanolom i inkubirala uzorke jednu minutu na sobnoj temperature te centrifugirala uzorke jednu minutu na 12 000 rpm. Zatim sam odlila supernatant i potom dodala 700 µL pufera za ispiranje s etanolom, ponovno centrifugirala jednu minutu na 12 000 rpm potom bacila supernatant. Talogu sam dodala 75 µL TE pufera i inkubirala uzorke jednu minutu na sobnoj temperaturi. Centrifugirala sam uzorke dvije minute na 12 000 rpm i pohranila uzorke s pročišćenom plazmidnom DNA na -20 °C.

3.2.3.1. Umnažanje gena *bla*_{TEM}

Umnažanje fragmenta gena *bla*_{TEM} ponavljala sam u više navrata koristeći različite početnice i DNA polimerazu kako bih dobila što referentnije rezultate.

Uvjeti PCR-a prema Arlet i sur. (1995) bili su: početna denaturacija pri 94 °C, 1 minuta (4 minute za prvi ciklus), temperatura prijanjanja početnica na kalup pri 55 °C, 1 minuta, sinteza

komplementarnih lanaca DNA produljivanje pri 72 °C, 1 minuta te završno produljivanje lanaca pri 72 °C, 7 minuta.

Tablica 8. Reakcijska smjesa po uzorku za lančanu reakciju polimeraze korištena za umnažanje fragmenata gena *bla_{TEM}*

Reagens	Volumen za PCR / μL
Sterilna dH ₂ O	9,5
Matična smjesa 2x (0,4 mM dATP; 0,4 mM dGTP; 0,4 mM dCTP; 0,4 mM dTTP i 3 mM MgCl ₂)	12,5
Kalup	1
OT3 (5 μM)	1
OT4 (5 μM)	1

3.2.4. Sekvenciranje i analiza nukleotidnih slijedova

Svi fragmenti gena za 16S rRNA umnoženi lančanom reakcijom polimerazom, sedam konstitutivnih MLST-gena te gena *bla_{TEM}* poslani su na određivanje primarne strukture DNA u komercijalni servis Genewiz (Leipzig, Republika Njemačka) čime sam dobila neobrađene sekvence koje sam potom uredila.

3.2.4.1. Uređivanje nukleotidnih slijedova dobivenih sekvenciranjem

Za uređivanje i sastavljanje sekvenci koristila sam računalni program Geneious Prime 2021 (<https://www.geneious.com>). Za svaki fragment sekvencirana su oba lanca te je stoga potrebno od dvije sekvence sastaviti konsenzus sekvencu. U program sam unijela i označila dobivene sekvence

i referentnu sekvencu te odabrala opciju *Map to reference* kako bi se sekvence posložile. Zatim sam sekvence po potrebi ručno uredila i kopirala u program Microsoft Word kako bih napravila dokument sa sekvencama u format FASTA.

U analizi gena za 16S rRNA i *bla*_{TEM} gena koristila sam i *on-line* alat Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) u svrhu pretraživanja i odabiranja srodnih sekvenci koje će biti korištene za filogenetske analize.

3.2.4.2. Filogenetska analiza

Uređene nukleotidne sekvence treba sravniti kako bi se omogućilo pronalaženje mutacija unutar sekvenci i pripremio set podataka za daljnje filogenetske analize gena za 16S rRNA. Za sravnivanje sekvenci koristila sam program ClustalX (Larkin i sur. 2007). Dokument.nex sam u programu MEGA X (Kumar i sur. 2018) pretvorila u format MEGA (document.meg). Filogenetske analize napravila sam korištenjem metode susjednog sparivanja (*Neighbor-joining*), modela *No. of differences* te statističke metode *Bootstrap* s 500 ponavljanja.

3.2.4.3. Multigenetska analiza (*Multilocus sequence typing; MLST*)

Nakon sekvenciranja i uređivanja sekvenci sedam gena svih odabranih izolata, za multigenetsku analizu (MLST) koristila sam *on-line* bazu PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/burkholderia-cepacia-complex>) koja je službena baza s podacima o svim do sada poznatim i tipiziranim izolatima.

Sekvencu svakog pojedinog gena iz FASTA formata kopirala sam i u bazi odabrala opciju *Query a sequence – Single sequence* – ime gena (primjerice *atpD*) nakon čega sam dobila podatak o najslbličnijem ili već poznatom alelu traženog gena, odnosno genotipa s pridruženim brojem i oznakom. U slučaju pronalaska novog i do sada nepoznatog alela (genotipa), administrator baze nakon provjere poslanih rezultata sekvenciranja odobrava novi alel (genotip) i pridružuje mu broj. Za određivanje kombinacije alela (genotipova) koji čine profil ST (*sequence type, ST*) odabrala sam opciju *Search for allelic profiles – By MLST allelic profile* gdje sam upisala dobivene alele i kao rezultat dobila konačni profil ST. Referentne sam sekvence pronašla u navedenoj bazi pod opcijom *Typing – Find alleles – By locus*.

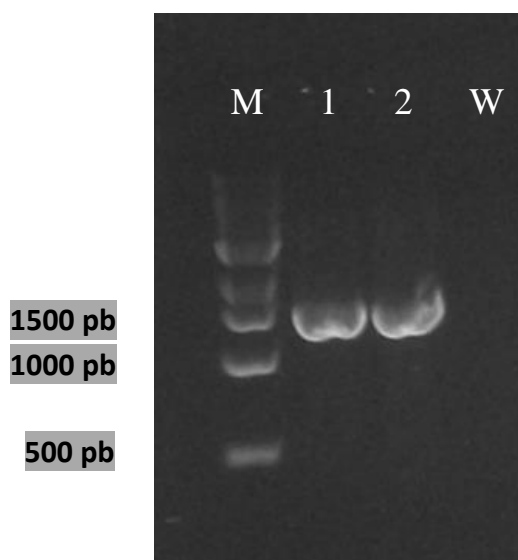
4. REZULTATI

4.1. Molekularna identifikacija analizom fragmenta gena za 16S rRNA

Prikupljenih sedam okolišnih i jedan klinički izolat prethodno su identificirani korištenjem metode MALDI-TOF MS (Microflex LT maseni spektrometar i MALDI Biotyper 3.0 softver, Bruker Daltonics, Njemačka) kao potencijalni pripadnici *Burkholderia* spp. (Hrenović i sur. 2021). MALDI-TOF MS bio je koristan u identifikaciji navedenih izolata, no metoda molekularne identifikacije omogućuje precizniju identifikaciju i analizu prikupljenih sojeva.

4.1.2. Umnažanje fragmenta gena za 16S rRNA

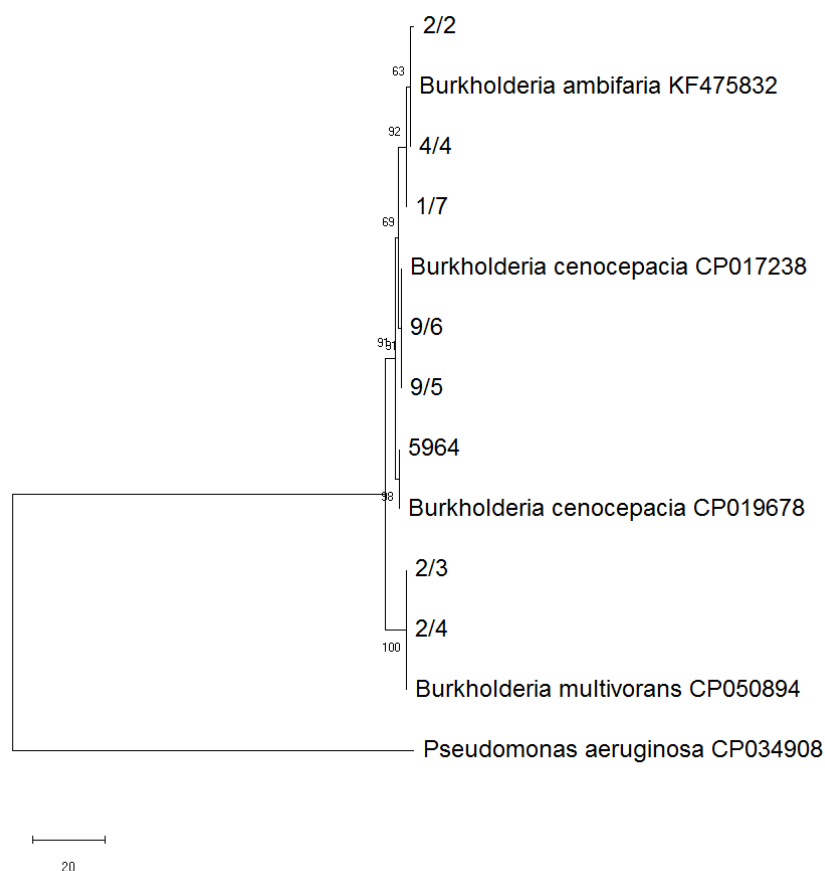
Iz svih uzoraka uspješno sam umnožila fragment gena za 16S rRNA veličine 1400 pb metodom PCR korištenjem univerzalnog para početnica P1/P2, a reprezentativni prikaz nalazi se na slici 4.



Slika 4. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze umnožene regije bakterijskog gena 16S rRNA korištenjem P1/P2 početnica. Oznakom **M** označen je 1 kb molekularni marker, oznakama **1** i **2** označeni su fragmenti gena uzoraka (2/2 i 5964) za 16S rRNA, a oznakom **W** označena je negativna kontrola, voda.

4.1.3. Filogenetska analiza gena za 16S rRNA

Filogenetska analiza fragmenata gena za 16S rRNA iz osam uzoraka bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa analiziranih u ovom radu pokazala je grupiranje u četiri različite filogenetske grane s referentnim sekvencama iz baze GenBank (Slika 5). Za tri uzorka utvrdila sam da pripadaju vrsti *B. cenocepacia* pri čemu postoji varijabilnost unutar vrste te je klinički uzorak 5964 pokazao identičnu sekvencu kao i klinički izolat iz pacijenta u Kanadi (pristupni broj CP019678), dok su se sekvence okolišnih uzoraka 9/5 i 9/6 izoliranih iz potoka i vode rijeke Krapine kod Zaboka grupirale sa sekvencom uzorka iz korjena kukuruza, također iz Kanade. Za uzorke izolata 2/2, 4/4 i 1/7 potvrdila sam pripadnost vrsti *B. ambifaria* dok uzorci 2/3 i 2/4 pripadaju vrsti *B. multivorans*.



Slika 5. Ukorijenjeno filogenetsko stablo napravljeno na temelju nukleotidnih sljedova gena za 16S rRNA. Sekvenca gena za 16S rRNA vrste *Pseudomonas aeruginosa* korištena je za ukorjenjivanje stabla. Pristupni brojevi iz baze GenBank nalaze se pored oznake sekvenca referentnih sojeva. Brojevi pored čvorova grana označavaju podržanost grananja u postocima.

Molekularnom identifikacijom potvrdila sam prisutnost sojeva bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa i odredila o kojim se vrstama radi. Identificirane vrste navedene su u Tablici 9.

Tablica 9. Identifikacija izolata *Burkholderia cepacia* kompleksa pomoću servisa MALDI-TOF MS te 16S rRNA amplifikacije

Izolat	MALDI-TOF MS vrsta	16S rRNA vrsta
2/3	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>
2/4	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>
9/5	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>
9/6	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>
1/7	<i>B. ambifaria</i>	<i>B. ambifaria</i>
2/2	<i>B. ambifaria</i>	<i>B. ambifaria</i>
4/4	<i>B. ambifaria</i>	<i>B. ambifaria</i>
5964*	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>

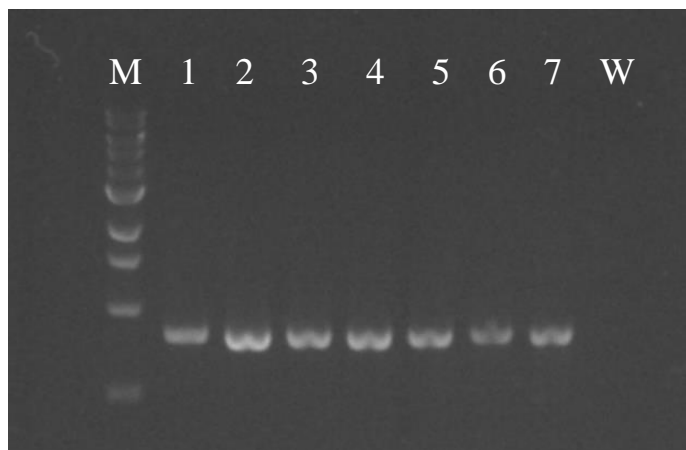
*klinički izolat

Razlika se očituje u identifikaciji uzorka 9/6 kojeg je MALDI-TOF MS identificirao kao vrstu *B. cepacia*, dok sam molekularnom identifikacijom utvrdila da se radi o vrsti *B. cenocepacia*.

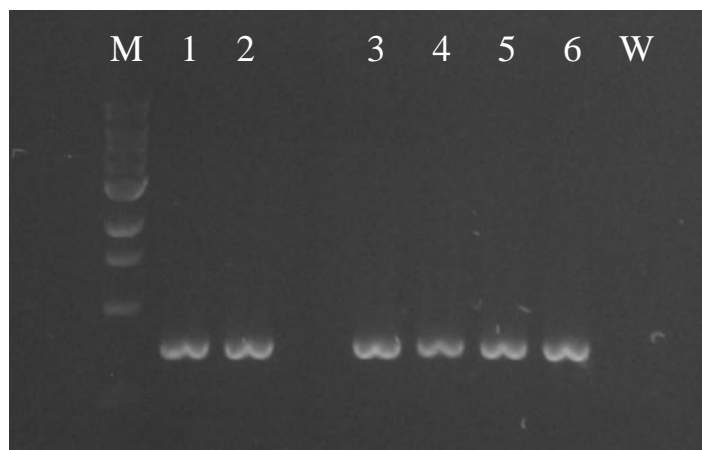
4.2. Analiza fragmenata MLST gena

4.2.1. Analiza umnoženih fragmenata gena elektroforezom

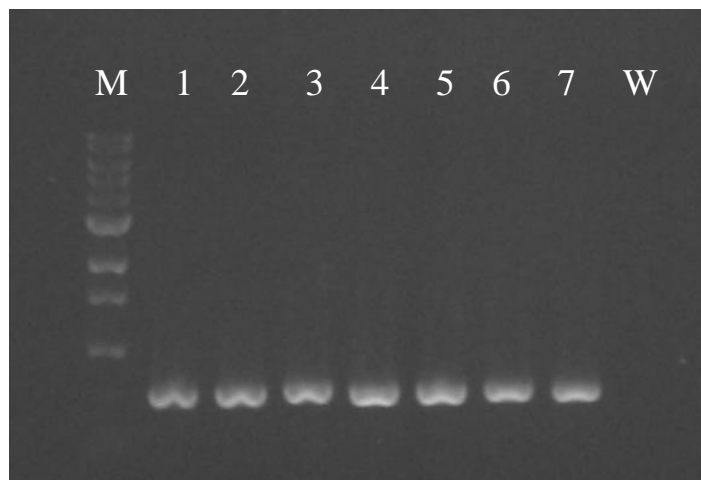
Fragmente gena *lepA*, *atpD*, *gyrB*, *gltB*, *phaC*, *recA* i *trpB* svih uzoraka uspješno sam umnožila metodom PCR koristeći početnice navedene u poglavlju 3.1.4. u Tablici 3. Reprezentativni prikazi nalaze se na slikama 6 – 12.



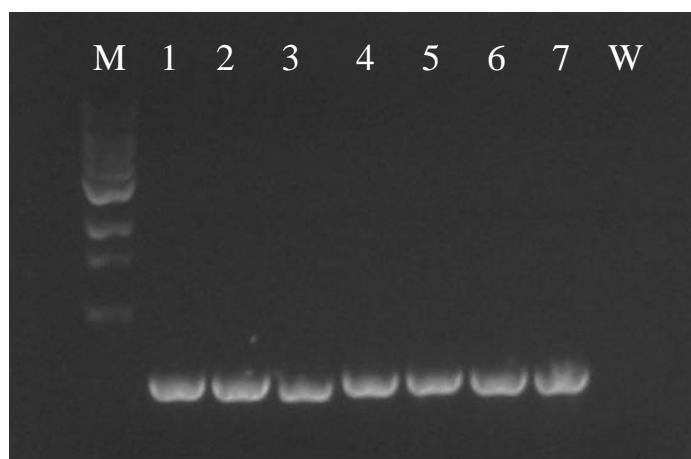
Slika 6. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze na gelu agaroze bakterijskog gena *lepA* metodom PCR-a. Oznakom **M** označen je marker. Oznakama **1-7** označeni su uzorci 2/3, 2/4, 9/5, 9/6, 1/7, 4/4 i 5964, a oznakom **W** označena je negativna kontrola, voda.



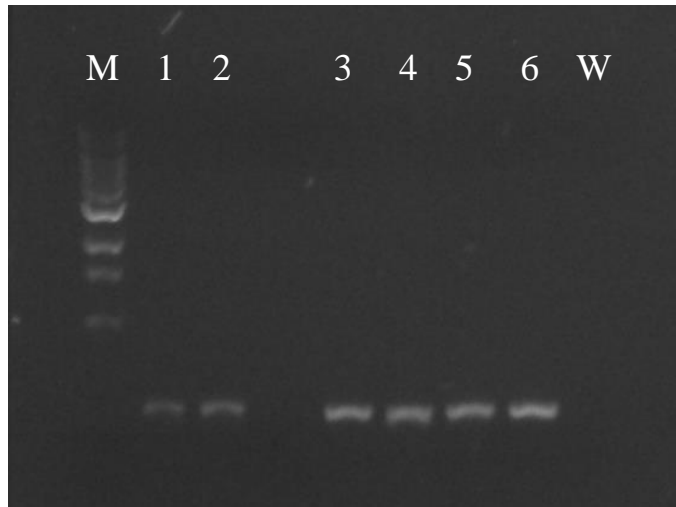
Slika 7. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze na gelu agaroze bakterijskog gena *atpD* metodom PCR-a. Oznakom **M** označen je marker. Oznakama **1-6** označeni su uzorci 2/3, 2/4, 9/6, 1/7, 4/4 i 5964, a oznakom **W** označena je negativna kontrola, voda.



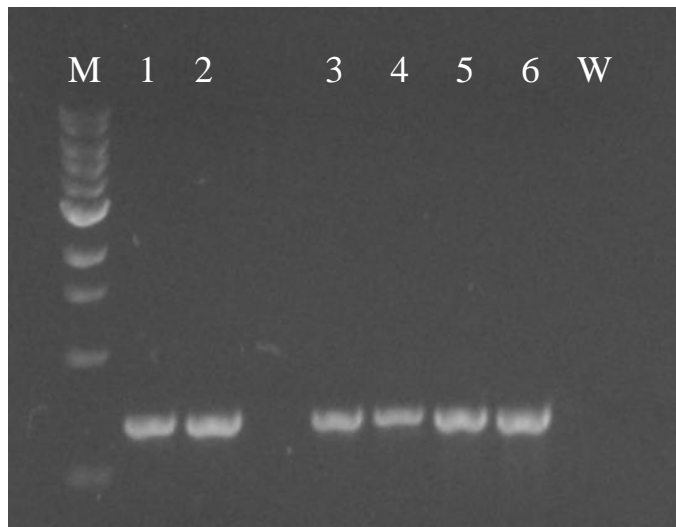
Slika 8. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze na gelu agaroze bakterijskog gena *gyrB* metodom PCR-a. Oznakom **M** označen je marker. Oznakama **1-7** označeni su uzorci 2/3, 2/4, 9/5, 9/6, 1/7, 4/4 i 5964, a oznakom **W** označena je negativna kontrola, voda.



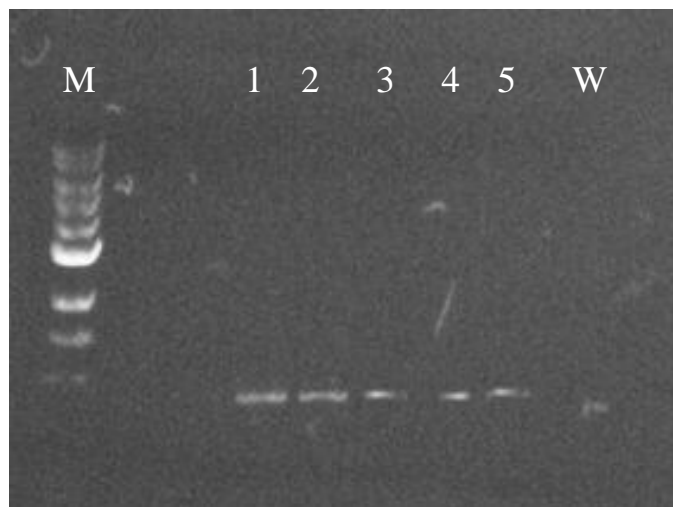
Slika 9. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze na gelu agaroze bakterijskog gena *gltB* metodom PCR-a. Oznakom **M** označen je marker. Oznakama **1-7** označeni su uzorci 2/3, 2/4, 9/5, 9/6, 1/7, 4/4 i 5964, a oznakom **W** označena je negativna kontrola, voda.



Slika 10. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze na gelu agaroze bakterijskog gena *phaC* metodom PCR-a. Oznakom **M** označen je marker. Oznakama **1-6** označeni su uzorci 2/3, 2/4, 9/5, 9/6, 1/7 i 4/4, a oznakom **W** označena je negativna kontrola, voda.



Slika 11. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze na gelu agaroze bakterijskog gena *recA* metodom PCR-a. Oznakom **M** označen je marker. Oznakama **1-6** označeni su uzorci 2/3, 2/4, 9/5, 9/6, 1/7 i 4/4, a oznakom **W** označena je negativna kontrola, voda.



Slika 12. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze na gelu agaroze bakterijskog gena *trpB* metodom PCR-a. Oznakom **M** označen je marker. Oznakama **1-5** označeni su uzorci 9/5, 9/6, 1/7, 4/4 i 5964, a oznakom **W** označena je negativna kontrola, voda.

4.2.2. Rezultati multigenске tipizacije

Nakon sekvenciranja i uređivanja sekvenci, metodom multigenске tipizacije za sve uzorke odredila sam tipove alela, odnosno genotipove, a nakon toga i profile ST (eng. *sequence type*; ST) koji se dobivaju kombinacijom svih sedam alela okarakteriziranih izolata prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1.2.

Provedena metoda pokazala je da oba izolata bakterije *B. multivorans* (2/3 i 2/4) pripadaju profilu ST19, dva izolata bakterije *B. ambifaria* (1/7 i 4/4) pokazuju profil ST927, dok je kod izolata iste vrste (2/2) uočena pojava novih alela za gene *gyrB* i *gltB*, pa je identificiran novi profil ST1877. Nadalje, kod sva tri izolata vrste *B. cenocepacia* otkriveni su novi genotipovi: izolati 9/5 i 9/6 pokazali su prisutnost novog alela za gen *gyrB* stoga su okarakterizirani novim genotipovima ST1878 i ST1879, dok je jedini klinički izolat analiziran u ovom radu također okarakteriziran novim genotipom ST1876 (Tablica 10).

Locus	Allele	Length	Contig	Start position	End position	Linked data values
gyrB	1209	454	Query	1	454	PubMLST isolates species: <i>Other BCC</i> [n=2]

Slika 13. Reprezentativni prikaz rezultata pretraživanja baze PubMLST za novi alel gena *gyrB* dobiven multigenomskom tipizacijom kod dva izolata bakterije *B. cenocepacia*

Tablica 10. Rezultati multigenomske tipizacije identificiranih izolata

Izolat	Vrsta	Genski lokusi*							
		<i>lepA</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>gltB</i>	<i>phaC</i>	<i>recA</i>	<i>trpB</i>	ST**
2/3	<i>B. multivorans</i>	7	12	118	6	100	9	6	19
2/4	<i>B. multivorans</i>	7	12	118	6	100	9	6	19
9/5	<i>B. cenocepacia</i>	113	106	1209	130	111	59	114	1878
9/6	<i>B. cenocepacia</i>	113	106	1209	130	144	59	114	1879
1/7	<i>B. ambifaria</i>	130	36	151	418	114	84	26	927
2/2	<i>B. ambifaria</i>	51	39	1210	835	608	707	49	1877
4/4	<i>B. ambifaria</i>	130	36	151	418	114	84	26	927
5964***	<i>B. cenocepacia</i>	11	130	489	11	6	143	79	1876

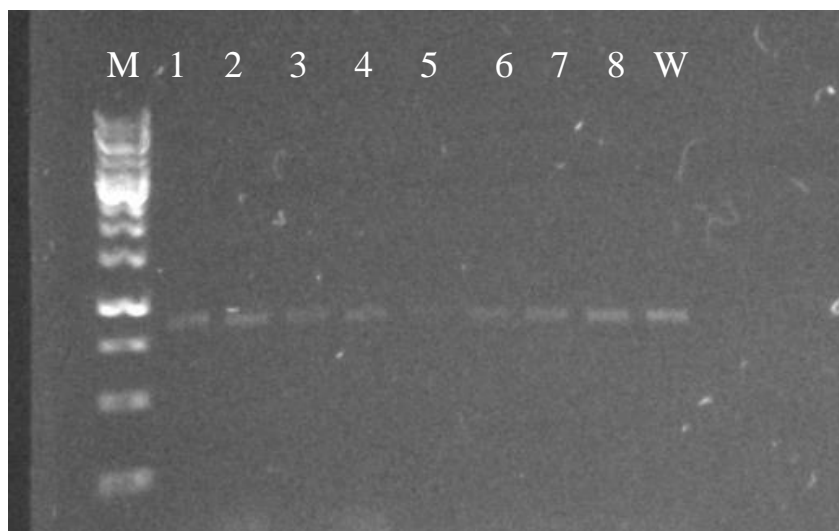
*brojevi navedeni uz genske lokuse predstavljaju identifikacijski broj pojedinog alela

**brojevi navedeni uz profil ST (*sequence type*, ST) predstavljaju identifikacijski broj dobiven kombinacijom svih alela

***klinički izolat

4.3. Analiza fragmenata gena bla_{TEM}

Kako bih pokazala mogućnost mehanizma rezistencije ovih izolata putem prisustva gena koji kodiraju β -laktamaze, provela sam analizu gena bla_{TEM} i iz genomske i iz plazmidne DNA.



Slika 14. Reprezentativni prikaz rezultata elektroforeze fragmenata gena bla_{TEM} umnoženih iz izolirane plazmidne DNA. Oznakom **M** označen je marker. Oznakama **1-8** označeni su uzorci 2/3, 2/4, 9/5, 9/6, 1/7, 2/2, 4/4 i 5964. Oznakom **W** označena je negativna kontrola, voda.

Fragmente gena bla_{TEM} uspješno sam amplificirala kod svih izolata bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa i iz genomske DNA kao i iz izolirane plazmidne DNA (Slika 14), no amplificirani fragment pojavljivao se i kod negativne kontrole (voda) i nakon promjene DNA polimeraze i uvjeta reakcije.

Sekvenciranjem fragmenata gena bla_{TEM} i pretraživanjem baze s već karakteriziranim sekvencama, identificirala sam prisutnost gena bla_{TEM-2} kod dvaju okolišnih izolata (2/4 i 2/2), bla_{TEM-1} kod jednog izolata (1/7), dok je gen $bla_{TEM-135}$ utvrđen samo kod jedinog kliničkog izolata (5964) (Tablica 11).

Sve identificirane sekvence pokazale su 100 %-tno podudaranje sa sekvencama gena identificiranih u bakterijama BCC kompleksa kao i kod nekih drugih bakterija, primjerice bakterije *KleibSELLa pneumonia*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Prisustvo gena *bla*_{TEM-116} utvrđeno je kod četiri izolata (2/3, 9/5, 9/6 i 4/4) kao i u fragmentu sekvenciranom iz negativne kontrole (voda). Ove sekvence pokazale su 100 % identiteta s već poznatim sekvencama u bazi podataka NCBI koje su porijeklom iz bakterijskih izolata, no većinom su identificirane iz plazmidnih vektora koji se koriste u molekularnoj biologiji i genetičkom inženjerstvu.

Tablica 11. Prisutnost pojedinih *bla*_{TEM} gena kod izolata *Burkholderia cepacia* kompleksa

Izolat	Vrsta	ST*	<i>bla</i> _{TEM}
2/3	<i>B. multivorans</i>	19	116***
2/4	<i>B. multivorans</i>	19	2
9/5	<i>B. cenocepacia</i>	1878	116***
9/6	<i>B. cenocepacia</i>	1879	116***
1/7	<i>B. ambifaria</i>	927	1
2/2	<i>B. ambifaria</i>	1877	2
4/4	<i>B. ambifaria</i>	927	116***
5964**	<i>B. cenocepacia</i>	1876	135

*profil ST (*sequence type*, ST)

**klinički izolat

***moguća kontaminacija

5. RASPRAVA

Bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa prisutne su u okolišu, ali i kao patogeni u ljudskom organizmu. Budući da bakterije ovog kompleksa nisu dio ljudskog mikrobioma, smatra se da je okoliš prirodni izvor zaraze ovih patogena. Unatoč tome, klinički relevantni sojevi bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa mogu dospjeti u okoliš neprimjerenim ispuštanjem ljudskog i životinjskog, krutog ili tekućeg otpada što rezultira porastom brojnosti patogenih sojeva u prirodnom okolišu i infekcija koje ovi patogeni mogu uzrokovati (Hrenović i sur. 2021).

Sposobnost metaboličkih promjena i biokemijskog profila bakterija ovog kompleksa otežava njihovo fenotipsko razlikovanje, no to nije jedini problemi koji se javlja pri identifikaciji ovih usko povezanih bakterijskih vrsta (Mahenthalingam i sur. 2008).

Molekularne dijagnostičke probe temeljene na PCR-u omogućuju brzu i visoko pouzdanu identifikaciju mikroba (Mahenthalingam i sur. 2000), dok se upotrebom drugih metoda često dobivaju dvojaki rezultati, stoga je metoda molekularne identifikacije iznimno važna kod bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa.

Molekularna analiza provedena u ovom radu dodatno je potvrdila da je riječ o genetički iznimno raznolikim vrstama koje je fenotipski teško razlikovati.

Rezultati molekularne identifikacije i multigenске tipizacije pokazali su da dva izolata vrste *Burkholderia multivorans* prikupljeni na ilegalnom odlagalištu otpada pripadaju profilu ST19. U PubMLST bazi podataka ovaj je genotip opisan samo kao klinički, pronađen kod pacijenata oboljelih od cistične fibroze, ali i kod pacijenata kojima nije dijagnosticirana CF. Iz toga se može zaključiti da postoji mogućnost da su ovi izolati *B. multivorans* u tlo na odlagalištu otpada gdje su pronađeni dospjeli iz krutog ljudskog otpada nepoznatog podrijetla.

Dvama izolatima vrste *Burkholderia ambifaria* pronađenima na poljoprivrednom tlu tretiranom svinjskim gnojem ili gnojem peradi pripisan je profil ST927, dok je analiza trećeg izolata ove vrste pronađenog na poljoprivrednom tlu oplemenjeno svinjskim gnojem, rezultirala otkrićem novog profila, ST1877. U PubMLST bazi zabilježena su samo dva slučaja genotipa ST927: jedan klinički izolat pacijenta koji ne boluje od CF u Belgiji te jedan okolišni izolat iz rizosfere kukuruza u Italiji. Prema tim podacima, smatra se da je *B. ambifaria* prisutna prirodno u tlu ili je tamo dospjela iz svinjskog gnojiva ili gnojiva peradi, no ova nagađanja potrebno je bolje istražiti. Važno je naglasiti

da *B. ambifaria* pronađena u oplemenjenom tlu predstavlja opasnost za ljude koji dođu u kontakt s takvim tlom zbog njene utvrđene rezistencije na većinu terapijski korištenih antibiotika (Hrenović i sur. 2021).

Nadalje, kod sva tri izolata vrste *Burkholderia cenocepacia*, od čega su dva okolišna pronađena u talogu potoka i vodi iz rijeke Krapine, te jedan klinički izolat uzet iz brisa rane, identificirani su novi genotipovi. Visoka razina detekcije novih genotipova predstavlja zabrinjavajuća otkrića o širenju i varijabilnosti bakterija *B. cepacia* kompleksa, kao i nedostatak istraživanja ovih bakterija u Hrvatskoj, kako okolišnih, tako i kliničkih sojeva. Zanimljivo je da nijedan izolat vrste *B. cenocepacia* analiziranih u ovom radu ne pripada genotipu ST856, koji je prema Vasiljević i sur. (2016) prevladavajući soj u susjednoj Srbiji što upućuje na cirkulaciju drugačijih sojeva u Hrvatskoj za razliku na ostatak balkanske regije.

Prisutstvo pojedine bakterijske vrste *Burkholderia cepacia* kompleksa i njezin genotip mogu biti povezani s mjestom pronalaska pojedinog izolata. Tako *B. multivorans* obitava u tlu na odlagalištu otpada, *B. ambifaria* u poljoprivrednom tlu, dok je *B. cenocepacia* vezana uz vodena staništa (sediment potoka i voda iz rijeke) i poznata kao klinički primjerak.

Unatoč tome, svaki izolat pokazao je zasebnu sliku u osjetljivosti/rezistenciji na antibiotike i prisutnosti gena *bla*_{TEM} iz čega proizlaze i mehanizmi rezistencije.

Prema Hrenović i sur. (2021) izolati s *bla*_{TEM} genima koji kodiraju za enzime β-laktamaze pokazali su određenu osjetljivost ili rezistenciju na ceftazidime i cefepime. Testirana je osjetljivost na ceftazidime, cefepim, imipenem, meropenem, minociklin, trimetoprim/sulfametaksazol i kloramfenikol. Svi izolati pokazali su neosjetljivost na imipenem što ukazuje na intrinzičnu rezistenciju ovih bakterija. Neosjetljivost kliničkog izolata na ceftazidim, cefepim, meropenem i minociklin pronađena je u većoj mjeri i kod okolišnih izolata, stoga prema Hrenović i sur. (2021) uočena visoka neosjetljivost na antibiotike ovih izolata sugerira na značajnu rasprostranjenost kliničkih sojeva pronađenih u okolišu. Jedino izolati 2/4 i 4/4 pokazali su pozitivan test na produkciju β-laktamaza proširenog spektra (ESBL) od čega je izolat 2/4 pokazao pozitivan test i na produkciju karbapenemaza (Hrenović i sur. 2021).

Maravić i sur. (2012) smatraju da višestruka rezistencija bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa proizlazi iz izvanredne prilagodljivosti ovih bakterija na pritisak izazvan antibioticima za što je

zaslužna slabo propusna vanjska membrana i konstitutivna ekspresija ispušnih pumpi za širok spektar supstrata te prirodno prisutne β -laktamaze klase A.

Kod bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa utvrđena je raznolikost bla_{TEM} gena koji kodiraju za enzime β -laktamaze širokog spektra (TEM-1,2) ili proširenog spektra (TEM-135). Uočena prisutnost TEM-116 β -laktamaze nije značajka vrsta *Burkholderia cepacia* kompleksa (Maravić i sur. 2012) budući da je najvjerojatnije rezultat kontaminacije DNA-polimerazom o čemu već postoje zabilježeni slučajevi (Koncan i sur. 2007). Svi uočeni bla_{TEM} geni kod istraženih izolata porijeklom su iz plazmida, što je prema do sada poznatim mehanizmima i najčešći slučaj.

Kod bakterija višestruko otpornih na antibiotike postavljaju se pitanja o učinkovitim mehanizmima rezistencije od kojih je otkriven sustav ispušnih pumpi koji je odgovoran za eliminaciju antibiotika i drugih stranih tvari, a osim toga i vanjska membrana koja usporava difuziju β -laktama i vezanje za penicilin-vezujući protein.

Mogući mehanizmi rezistencije nisu dovoljno istraženi, a stopa višestruko otpornih izolata BCC bakterija u okolišu rapidno raste. Iz tog razloga, potrebna su daljnja detaljna istraživanja o genima koji kodiraju za β -laktamaze proširenog spektra, kao i o ostalim mogućim mehanizmima rezistencije, kako bi se dobila šira i potpunija slika o rezistenciji na antibiotike ovih oportunističkih organizama.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata, izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Svih sedam izolata pronađenih u okolišu i jedan klinički izolat uspješno su identificirani kao vrste *Burkholderia cepacia* kompleksa molekularnom analizom gena za 16S rRNA.
2. Filogenetska analiza bakterijskog gena za 16S rRNA potvrdila je rezultate molekularne identifikacije i pripadnost analiziranih izolata vrstama *Burkholderia cepacia* kompleksa.
3. Metodom multigeneske tipizacije uspješno su dobiveni genotipovi izolata kombinacijom njihovih sedam alela, od čega su ukupno opisana četiri nova genotipa, odnosno profila ST.
4. Mehanizam rezistencije uzrokovan prisutnošću *bla*_{TEM} gena u plazmidu dokazan je kod ukupno četiri izolata.

7. LITERATURA

Abram M., Banac S., Rožmanić V. 2007. Mikrobiološka analiza respiratornih uzoraka u djece s cističnom fibrozom. *Medicina* 43, 34-38.

Arlet G., Bami G., Decre D., Flippo A., Gaillot O., Lagrange P.H., Philippon A. 1995. Molecular characterization by PCR restriction fragment polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol. Lett.* 134, 203-208.

Becka S.A., Zeiser E.T., Barnes M.D., Taracila M.A., Nguyen K., Singh I., Sutton G.G., LiPuma J.J., Fouts D.E., Papp-Wallace K.M. 2018. Characterization of the AmpC β -lactamase from *Burkholderia multivorans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e01140-18.

Coenye T., Vandamme P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* 5(9), 719-729.

Compant S., Nowak J., Coenye T., Clément C., Ait Barka E. 2008. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol Rev* 32, 607– 626.

Hauser N., Orsini J. 2015. Cepacia Syndrome in a Non-Cystic Fibrosis Patient. *Case Reports in Infectious Diseases*, 537627.

Henry D.A., Mahenthalingam E., Vandamme P., Coenye T., Speert D.P. 2001. Phenotypic Methods for Determining Genomovar Status of the *Burkholderia cepacia* Complex. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1073-1078.

Hrenović J., Ivanković T., Durn S., Dekić S., Kazazić S., Kisić I. 2019a. Presence of carbapenem-resistant bacteria in soils affected by illegal waste dumps. *Int. J. Environ. Health Res.* 29, 154-163.

Hrenović J., Durn G., Kazazić S., Dekić S., Šeruga Musić M. 2019b. Untreated wastewater as a source of carbapenem-resistant bacteria to the riverine ecosystem. *Water SA* 45, 55-62.

Hrenović J., Šeruga Musić M., Drmić M., Pešorda L., Bedenić B. 2021. Characterization of *Burkholderia cepacia* complex from environment influenced by human waste, *International Journal of Environmental Health Research*, <https://doi.org/10.1080/09603123.2021.1943325>

Hwang J., Kim H.S. 2015. Cell Wall Recycling-Linked Coregulation of AmpC and PenB beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 7602–7610.

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.

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

Koncan R., Valverde A., Morosini M., Garcia-Castillo M., Canton R., Cornaglia G., Baquero F., del Campo R. 2007. Learning from mistakes: *Taq* polymerase contaminated with b-lactamase sequences results in false emergence of *Streptococcus pneumoniae* containing TEM. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, 702-707.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547-1549.

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. 2007. ‘Clustal W and Clustal X version 2.0’, *Bioinformatics*, 23(21), pp. 2947-2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.

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

Mahenthalingam E., Bischof J., Byrne S.K., Radomski C., Davies J.E., Av-gay Y., Vandamme P. 2000. DNA-Based Diagnostic Approaches for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* Genomovars I and III. *Journal of Clinical Microbiology* 9, 3165-3173.

Mahenthalingam E., Urban T.A., Goldberg J.B. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* 3, 144-156.

Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant A.D., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3140-3145.

Mannweiler O., Pinto-Carbó M., Lardi M., Agnoli K., Eberl L. 2021. An investigation of *Burkholderia cepacia* complex methylomes via SMRT sequencing and mutant analysis. *Journal of Bacteriology*. Mar 22;203(12):e00683-20. doi: 10.1128/JB.00683-20

Maravić A., Skočibušić M., Šprung M., Šamanić I., Puizina J., Pavela-Vrančić M. 2012. Occurrence and antibiotic susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex in coastal marine environment. *International Journal of Environmental Health Research* 22, 531-542.

Miller S.C.M., Li Puma J.J., Parke J.L. 2002. Culture-Based and Non-Growth-Dependent Detection of the *Burkholderia cepacia* Complex in Soil Environments. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3750-3758.

Pavlica M., Zoldoš V., Biruš I., Cvjetko P., Horvat T., Malenica N., Mlinarec J., Vičić V. 2013. *Praktikum iz genetike - skripta*.

Rhodes K.A., Schweizer H.P. 2016. Antibiotic Resistance in *Burkholderia* Species. *Drug Resist Updat*. 28, 82-90.

Spilker T., Baldwin A., Bumford A., Dowson C.G., Mahenthiralingam E., LiPuma J.J. 2009. Expanded Multilocus Sequence Typing for *Burkholderia* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 2607-2610.

Tablan O.C., Chorba T.L., Schidlow D.V., White J.W., Hardy K.A., Gilligan P.H., Morgan W.M., Carson L.A., Martone W.J., Jason J.M. i sur. 1985. *Pseudomonas cepacia* colonization in patients with cystic fibrosis: risk factors and clinical outcome. *The Journal of Pediatrics* 107, 382-387.

Tavares M., Kozak M., Balola A., Sá-Correia I. 2020. *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. *Clinical Microbiology Reviews* 33, e00139-19.

Vasiljević Z.V., Novović K., Kojić M., Minić P., Sovtić A., Đukić S., Jovčić B. 2016. *Burkholderia cepacia* complex in Serbian patients with cystic fibrosis: prevalence and molecular epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 1277-1248.

Jin Y., Zhou J., Zhou J., Hu M., Zhang Q., Kong N., Ren H., Linag L., Yue J. 2020. Genome-based classification of *Burkholderia cepacia* complex provides new insight into its taxonomic status. *Biology Direct* 15, 6.

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. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 1085-1088.

Zhou J., Ren H., Hu M., Zhou J., Li B., Kong N., Zhang Q., Jin Y., Liang L., Yue J. 2020. Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Core Genome and the Underlying Recombination and Positive Selection. *Frontiers in Genetics* 11, Article 506.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 27. listopada 1997. u Zagrebu gdje sam završila osnovnu školu i opći smjer Gimnazije Sesvete. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2016. godine. Tijekom studija sudjelovala sam u radionicama na manifestacijama “Otvoreni dani kemije” te “Dan i noć na PMF-u”. Koautorica sam znanstvenog rada objavljenog u časopisu International Journal of Environmental Health Research.