

KİSTİK FİBROZİS HASTALARINDA *BURKHOLDERIA CEPACIA* COMPLEX İZOLASYONU VE TANIMLANMASI*

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *BURKHOLDERIA CEPACIA* COMPLEX FROM CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

Pınar YURDAKUL**, **Koray ERGÜNAY****, **Ebru YALÇIN*****
Deniz DOĞRU***, **Burçin ŞENER****, **Nazan ÇOBANOĞLU*****
Uğur ÖZÇELİK***, **Nural KİPER*****

ÖZET: Bu çalışmada, akciğer enfeksiyonu ön tanısı almış kistik fibrozisli hastalarda *Burkholderia cepacia* complex grubu bakterilerin varlığı ticari fenotipik yöntemler ve *recA* polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Çalışmaya alınan 85 hastanın yaş aralığı 5–30 (ortalama: 12.8) yıl ve kadın/erkek oranı 44/41'dir. Ticari yöntemlerle incelenen 85 balgam örneğinden izole edilen bakteriler arasında ilk üç sırayı *Staphylococcus aureus* (%55.3), *Pseudomonas aeruginosa* (%48.2) ve *Haemophilus influenzae* (%15.3) almış, örneklerin ikisinden (%2.3) ise *B.cepacia* complex izolasyonu yapılmıştır. Ancak *B.cepacia* complex izole edilen iki örnekten sadece birisi *recA* PCR ile doğrulanmış ve bu izolat restriksiyon enzim analizi ile *Burkholderia multivorans* olarak tanımlanmıştır. Sonuçlarımız, *B.cepacia* complex grubu bakterilerin doğru tanımlanmasında moleküler yöntemlerin önemine dikkati çekmektedir.

Anahtar sözcükler: *Burkholderia*, *Burkholderia cepacia* complex, kistik fibrozis.

ABSTRACT: In this study, sputum samples collected from cystic fibrosis patients with preliminary diagnosis of pulmonary infection were evaluated for the presence of bacteria belonging to *Burkholderia cepacia* complex by commercial phenotypic systems and *recA* polymerase chain reaction (PCR). A total of 85 patients ages between 5–30 years (mean age: 12.8 years) were included to the study with female/male ratio of 44/41. The mostly isolated bacteria from 85 sputum samples were found as *Staphylococcus aureus* (55.3%), *Pseudomonas aeruginosa* (48.2%) and *Haemophilus influenzae* (15.3%), whereas *B.cepacia* complex was phenotypically identified from two (2.3%) out of the samples.

* Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje no: 0202 101027) tarafından desteklenmiştir.

** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

*** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Pediatri Anabilim Dalı, Göğüs Hastalıkları Ünitesi, Ankara.

However only one was confirmed by PCR and typed as *Burkholderia multivorans* by restriction fragment lenght polymorphism method. This study emphasizes the importance of molecular methods as confirmatory tests for accurate identification of *B.cepacia* complex.

Key words: Burkholderia, Burkholderia cepacia complex, cystic fibrosis.

GİRİŞ

Burkholderia cepacia complex grubunda yer alan bakteriler, özellikle kistik fibrosis, kronik granülomatöz hastalık ya da çeşitli immün süpresyon durumlarında önem kazanan fırsatçı patojenlerdir. Kistik fibrozis hastalarında *B.cepacia* complex hem akciğer semptomlarını belirgin olarak artırmakta hem de "Cepacia sendromu" adı verilen ağır bir pnömoniye neden olmaktadır. Cepacia sendromu, bakteriyemi ile birlikte izlenen ve %20 mortaliteye neden olan nekrotizan bir pnömonidir. *B.cepacia* complex ayrıca hastalar arasında bulaş göstermesi ve birçok antibiyotiğe dirençli oluşu ile özellikle belirli hasta grupları için hızlı ve güvenilir tanı uygulamalarına ihtiyaç gösteren önemli bir bakteriyel patojen olarak karşımıza çıkmaktadır^{1,2}.

Bu çalışmada, kistik fibrozisli hastaların balgam örneklerinde, fenotipik ve moleküler yöntemler kullanılarak *B.cepacia* complex varlığının araştırılması ve tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Grubu ve Örneklerin Hazırlanması: Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Göğüs Hastalıkları Kliniği tarafından takip edilen ve poliklinik muayenelerinde akciğer enfeksiyonu ön tanısı almış 85 kistik fibrosis hastası, kendilerinden ya da ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onam alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi. Çalışma grubunda ortalama yaş 12.8 (dağılım aralığı: 5–30) yıl ve kadın/erkek oranı 44/41 idi. Hastalardan mikrobiyolojik inceleme için steril kaplara balgam örneği alındı ve bir saat içerisinde değerlendirme için laboratuvara gönderildi. Balgam örnekleri, önceden belirtildiği şekilde taze olarak hazırlanmış Sputolysin® (Sigma, UK) ile eşit hacimde karıştırılarak 37°C'de 30 dakika inkübe edildi^{2,3}.

B.cepacia Complex İzolasyonu ve Tanımlanması: Sputolizin muamelesi uygulanmış balgamdan 10'ar µl alınarak %5 koyun kanı içeren kanlı agar ve OFPBL (Oksidatif Fermentatif Polimiksin B Basitrasin, Oxoid, UK) agara ekim yapıldı, 37°C'de 48–72 saat inkübe edildi^{2,3}. İnkübasyon sonunda OFPBL agarda izlenen koloniler oksidaz testine alındı; oksidazı pozitif olarak saptanan bakteri kolonileri Crystal® (Becton–Dickinson) ve Phoenix® (Becton–Dickinson) otomatize sistemleri ile üreticinin önerileri doğrultusunda tanımlandı.

B.cepacia Complex Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Amplifikasyonu ve Restriksiyon Enzim Analizi: Sputolizin muamelesinin ardından örnekler 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 0.2 ml TE tamponu (10mM TRIS, 1 mM EDTA) ile tekrar süspanse edildi. Bu örneğin 100 µl'si alındı ve "High Pure PCR Template Kit® (Roche Diagnostics, Germany)" ile üreticinin önerileri doğrultusunda nükleik asit saflaştırması yapıldı.

B.cepacia complex *recA* gen bölgesi, BCR-1 ve BCR-2 primerleri kullanılarak önceden tanımlanan tek oturumlu PCR yöntemi kullanılarak amplifiye edildi^{2,3}. Kullanılan primerlerin nükleotid dizileri BCR-1: 5'- TGA CCG CCG AGA AGA GCA A-3' ve BCR-2: 5'- CTC TTC TTC GTC CAT CGC CTC -3' şeklinde idi.

Kontaminasyonun önlenmesi için, ön hazırlık ve nükleik asit saflaştırılması, PCR karışımının hazırlanması ve elektroforez işlemleri farklı laboratuvarlarda gerçekleştirildi.

Çalışmada, *B.cepacia* complex (KK 7394 Neqas, UK) referans suşu pozitif kontrol, laboratuvarda izole edilen ve Phoenix® (Becton-Dickinson) otomatize sistemi ile tanımlanan bir *Pseudomonas putida* suşu negatif kontrol olarak kullanıldı. *B.cepacia* complex (KK 7394 Neqas) OFPBL ve %5 koyun kanlı agar; *P.putida* ise McConkey ve %5 koyun kanlı agarda üretildi. Kültürden elde edilen bakteriler 1 ml TE tamponu içerisinde süspanse edildi, 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pellet 0.2 ml TE ile tekrar süspanse edildikten sonra "High Pure PCR Template Kit® (Roche Diagnostics, Germany)" ile nükleik asit saflaştırmasını takiben PCR için pozitif ve negatif örnek olarak kullanıldı.

PCR yönteminin balgam örnekleri için validasyonu ve muhtemel PCR inhibitörlerinin varlığının saptanması amacıyla, çalışma grubuna dahil olmayan bir kistik fibrosis hastasının balgamı *B.cepacia* complex (KK 73 Neqas) kalite kontrol suşu ile toplam bakteri konsantrasyonu 10⁷ cfu/ml olacak şekilde karıştırıldı ve diğer balgam örnekleri için tarif edildiği şekilde saflaştırma ve amplifikasyon işlemlerine alındı.

Pozitif sonuç elde edilen PCR ampikonlarından 10 µl'si *B.cepacia* complex *recA* restriksiyon enzim analizi için alındı. *HaeIII* ve *MnII* (Fermentas) enzimleri üreticinin önerileri doğrultusunda kullanılarak önceden tanımlanan şekilde tiplendirme yapıldı^{2,3}. Yüzde 2.5 agaroz jel elektroforezi sonrasında etidyum bromid ile boyandı ve ultraviyole ışık altında inceleme sonrasında elde edilen restriksiyon bantları değerlendirildi^{2,3}.

B U L G U L A R

Çalışma grubuna dahil edilen her hastadan 2005 yılı süresince, *B.cepacia* complex izolasyonu için kullanılan örnek de dahil olmak üzere 1-5 örnek mikrobiyolojik olarak incelenmiştir. Örneklerden fenotipik yöntemlerle izole edilen diğer bakteriyel ya da fungal ajanlar Tablo I'de gösterilmiştir.

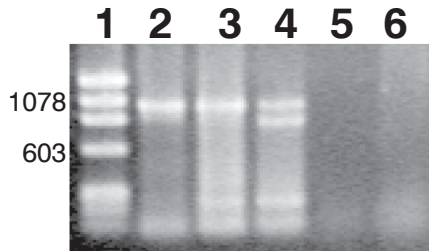
Konvansiyonel kültür yöntemi ile örneklerin ikisinden (%2.3) izole edilen *B.cepacia* complex, Crystal® (Becton-Dickinson) ve Phoenix® (Becton-Dickinson) otomatize sistemleri ile tanımlanmıştır.

Referans suş ve deneysel olarak inoküle edilen balgamda, 1040 bazçiftlik beklenen büyüklükte PCR ampikonları elektroforez sonrasında izlenmiştir (Şekil 1). Kültürde *B.cepacia* complex izole edilen iki örneğin birinde *recA* PCR ile amplifikasyon gösterilmiş; diğer örnekler tekrarlayan uygulamalara karşın negatif olarak izlenmiştir (Şekil 1). Restriksiyon enzim analizi sonucunda PCR pozitif izolat

B.multivorans olarak tanımlanmıştır. Bu izolatı taşıyan kistik fibrozis hastası, aynı anda *P.aeruginosa*, *S.aureus* ve *H.influenzae* ile kolonize olduğu saptanan 12 yaşında bir kız çocuğudur. Hasta, yüksek ateş, öksürük ve balgam çıkarma şikayetleri ile polikliniğe başvurmuş, yapılan incelemesinden sonra hastaneye yatırılarak tedaviye alınmıştır. Üç yıl önce lobektomi uygulanmasına karşın sol akciğerinde hala yaygın bronşiektazi ve atelektazi alanları izlenmiştir. Elde edilen izolatın amikasin ve sefepime duyarlı, imipenem, meropenem, tobramisin, siprofloksazin, seftazidim ve aztreonama dirençli olduğu standart disk difüzyon testiyle saptanmış, ayrıca indüklenebilir β -laktamaz oluşturduğu gözlenmiştir. Yatışını takiben hasta sefepim ve amikasin ile başarılı şekilde tedavi edilmiştir.

Tablo 1: Toplam 85 Hastanın Balgam Örneklerinden Fenotipik Yöntemlerle İzole Edilen Mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Sayı (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	47 (55.3)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41 (48.2)
<i>Haemophilus influenzae</i>	13 (15.3)
<i>Escherichia coli</i>	5 (5.8)
<i>Burkholderia cepacia</i> complex (Bcc)	2 (2.3)
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	2 (2.3)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2 (2.3)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (1.2)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1 (1.2)
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (1.2)
<i>Klebsiella</i> spp.	1 (1.2)
<i>Hafnia alvei</i>	1 (1.2)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1 (1.2)
<i>Candida albicans</i>	1 (1.2)



Şekil 1: Bcc *recA* bölgesinin PCR amplifikasyonu [1: Φ X174 (BsuRI) moleküler ağırlık standardı, 2: Bcc (KK 73 Neqas) referans suş amplifikasyonu, 3: Referans suş eklenmiş balgam örneği amplifikasyonu, 4: Pozitif balgam örneği, 5 ve 6: Negatif örnek ve kontrol].

T A R T I Ş M A

B.cepacia complex birbirlerine fenotipik olarak benzerlik gösteren 9 ayrı genomovar olarak incelenen bir grup Gram negatif bakteridir^{1,4}. Kistik fibrozis hastalarında en sık olarak izole edilen *B.cepacia* complex türleri *B.cenocepacia* ve *B.multivorans* olmasına karşın, komplekse ait tüm türler izlenebilmektedir⁵. Bu çalışmada incelenen akciğer enfeksiyonu ön tanısı ile takip edilen kistik fibrozisli kişilere ait 85 balgam örneğinin ikisinde *B.cepacia* complex ticari fenotipik yöntemlerle saptanmıştır. Bu iki izolatin sadece biri *recA* PCR ile pozitif sonuç vererek restriksiyon enzim analizi ile *B.multivorans* olarak tanımlanmıştır. *B.cepacia* complex tanımlanmasında fenotipik ve moleküler testler arasında ortaya çıkan bu uyumsuzluk, klinik laboratuvarıda tanı açısından önem taşımaktadır. Ticari fenotipik tanımlama sistemlerinin *B.cepacia* complex grubu bakterilerin tanımlanmasında nispeten düşük duyarlılığa sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, farklı türlere ait bakterilerin de ticari sistemler tarafından *B.cepacia* complex grubu bakteriler olarak tanımlanabildiği rapor edilmiştir⁶⁻⁸. *B.cepacia* complex grubu bakterilerin saptanması ve tanımlanması için bazı fenotipik yöntemler tariflenmiş, bu yöntemlerin bazı bakteriler için tür düzeyinde tanımlama olanağı sunabileceği gösterilmiştir. Ancak uygulanan yöntemlerde izlenen farklılıklar ve türler arasında meydana gelen fenotipik varyasyonlar, bu testlerde de uyumsuz sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle fenotipik yöntemlerle *B.cepacia* complex grubu bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmalarının, deneyimli referans laboratuvarları tarafından doğrulanması önerilmektedir^{9,10}.

Çalışmada incelenen kistik fibrozisli hasta popülasyonunda *B.cepacia* complex nadir karşılaşılan bir izolat olarak karşımıza çıkmış olmasına karşın, bu bakterinin hastalarda izlenen yüksek morbidite ve mortalite oranları göz önünde bulundurulmalı ve tanımlanmasına özellikle dikkat edilmelidir. *B.cepacia* complex izolatlarının tanımlanması ve tiplendirmesinde sadece fenotipik yöntemlerin kullanılması hatalı sonuçlar doğurabilmektedir. Bu nedenle elde edilen sonuçların moleküler yöntemlerle doğrulanması önerilmektedir. *B.cepacia* complex izolatlarının genomovar düzeyinde tanımlanması da, etkenin diğer kistik fibrozisli hastalar arasında bulaşmasının önlenmesi ve uygun enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanabilmesine imkan tanınması açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Coenye T, VanDamme P, Govan JRW, Lipuma JJ. Taxonomy and identification of *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol 2001; 39: 3427-46.
2. McDowell A, Mahenthalingam E, Moore JE, et al. PCR-based detection and identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patient. J Clin Microbiol 2001; 39: 4247-55.
3. Mahenthalingam E, Bischof J, Bryne SK, et al. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis* and *Burkholderia cepacia* genomovars I and II. J Clin Microbiol 2000; 38: 3165-73.
4. VanDamme P, Henry D, Coenye S, et al. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. FEMS Immunol Med Microbiol 2002; 154: 91-6.

5. Lipuma JJ, Spilker T, Gill HL, PW Campbell III, Liu L, Mahenthiralingam E. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 92–6.
6. Kiska DL, Kerr A, Jones MC, et al. Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative, nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 886–91.
7. McMenamin JD, Zacccone TM, Coenye T, Vandamme P, Lipuma JJ. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in U.S. cystic fibrosis treatment centers: an analysis of 1051 recent sputum isolates. *Chest* 2000; 117: 1661–5.
8. Shelly DB, Spilker T, Gracely EJ, Coenye T, Vandamme P, Lipuma JJ. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3112–5.
9. Henry DA, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Coenye T, Speert DP. Biochemical and molecular approaches for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1073–8.
10. Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 144–56.