

# Abstract

The *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) is a group of genetically related environmental bacteria that can cause chronic opportunistic infections in patients with cystic fibrosis (CF) and other underlying diseases. The *B. cenocepacia* specie is one of the most threatening bacterial pathogens in CF. This bacterium is very difficult to eradicate from the lungs due to their intrinsic resistance to multiple antibiotics and antimicrobial peptides of the innate immunity and the development of higher levels of multidrug resistance. A better understanding of how bacteria adapt to the CF airway and resist to the host defence mechanisms including therapeutically administered antibiotics is crucial to deal with these chronic infections, therefore, claiming for faster diagnosis methods. This thesis proposes a high-throughput method based on Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy to discriminate bacteria of the Bcc using multivariate methods (chemometrics) to assist data analysis.

This thesis was based on a collection of Bcc isolates collected at the Santa Maria Hospital (HSM) in Lisbon/Portugal from clinically infected CF patients. These were previously characterized by established molecular methods at the species level and differentiated at the strain level, based on their ribopatterns. A hundred eighty five isolates, representing four different Bcc species (*Burkholderia cepacia*, *Burkholderia cenocepacia* (*recA* lineages IIIA and III-B), *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia stabilis*) and 15 ribopatterns were available for analysis.

The FTIR spectroscopy methodology for the differentiation of Bcc clinical isolates at the species and ribopatterns levels using Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy and chemometrics analysis was initially addressed. The discrimination at the species level led to misclassification error rates of 10 % for the HSM isolates. A poor result was obtained for a test set composed of reference strains (32 % error), indicating some generalization limitations of the method at the species level. Regarding the discrimination according to the ribopatterns, results showed misclassification error rates of 4 %, 2 %, and 8 % for *B. cepacia*, *B. cenocepacia recA* lineages IIIA and *B. cenocepacia recA* lineages III-B ribopatterns, respectively. These results provided an indication that the FTIR based method might perform better on strongly related bacterial strains, which led to the decision to restrict the analysis to a set of closely related strains. With this aim, the phenotypic assessment of eleven *B. cenocepacia* obtained from a chronically infected CF patient during periodic consultation was accomplished. The clonal nature of these isolates was confirmed based on their multilocus sequence typing (MLST) profiles. Phenotypic characterization included susceptibility assays against different classes of antimicrobials (ceftazidime, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, imipenem and trimethoprim-sulfamethoxazole), cell motility, cell hydropho-

bicity, zeta potential, colony and cell morphology, fatty acid composition, growth under iron limitation/load conditions, exopolysaccharides production and size of formed biofilms. For most of the characteristics tested, in particular for antimicrobial susceptibility levels, no time-dependent consistent alteration pattern could be identified. However, results suggested a remarkable clonal expansion during long term colonization. The properties of the isolate that initiated the infection differed significantly from those of obtained during the course of infection. This could be due to the application of intravenous antibiotic therapy at specific time periods. In particular, antimicrobial susceptibility and swarming motility were consistently higher compared with the subsequent isolates and the contrary was found for the zeta potential and growth efficiency under iron limitation. The assessment of the FTIR spectroscopy method for differentiating these eleven isolates was performed by testing distinct growth conditions (cultivation media, growth time and atmospheric conditions). The effects of these conditions on the FTIR spectra were initially evaluated and results demonstrated essentially that higher spectral variability was captured on 48h cultures when compared to 13h and 24h cultures, independently of the media used. The ability of the FTIR spectroscopy method to differentiate these related isolates was accomplished independently of the growth media. Microaerophilic growth proved however to yield non-reproducible spectral patterns, thus unlike to be successfully used in practice. It was observed using principal components analysis, that the information present in the FTIR spectra followed a similar pattern when compared to the phenotypes. FTIR spectra of isolates grown on aerophilic conditions with different media and growth times were modeled against the different phenotypes by partial least squares regression. Results indicate that FTIR spectra can be used to assess many of the analyzed phenotypes. Exopolysaccharides production, colonies size, cells morphology and swarming yielded the best results. Results indicated that the influence of the media and growth time is crucial for the optimization of the methodology outcome (in this case, cultivation on PIA for 48 hours yielded the optimal results).

Overall, this thesis demonstrates the usefulness of the FTIR spectroscopy based method as a tool for fast discrimination and phenotype characterization of Bcc bacteria. Its performance was especially good for closely related bacteria (same specie and same ribopattern). The proposed methodology presents several advantages such as the simplicity, low cost per analysis, flexibility, accuracy and short analysis time. This work also produced important clues on the persistence strategies used by *B. cenocepacia* during progressive CF lung disease.

**Keywords:** *Burkholderia cepacia* complex, Fourier-transform infrared spectroscopy, Chemometrics, Cystic fibrosis, Bacteria differentiation.

# Resumo

O complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) é um grupo de bactérias ambientais geneticamente relacionadas que podem causar infecções oportunistas em doentes com fibrose quística (FQ) e com outro tipo de doenças. A *B. cenocepacia* é uma das espécies bacterianas patogénicas mais ameaçadoras para os doentes de FQ. Esta espécie é de muito difícil erradicação do ambiente pulmonar, devido à sua resistência intrínseca a vários antibióticos, peptídeos antimicrobianos da imunidade inata e ao desenvolvimento de altos níveis de multi-resistência. Um melhor entendimento de como as bactérias se adaptam às vias respiratórias de um doente de FQ para resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro, incluindo aos anti-microbianos administrados durante o período de terapêutica é um aspecto crucial para entender a problemática envolvida nas infecções crónicas, permitindo o desenvolvimento de métodos mais rápidos de diagnóstico. Esta tese propõe um método de alto-débito baseado na espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), para a discriminação de bactérias de Bcc usando métodos multivariados (quimiometria) como auxílio ao tratamento dos dados. Esta tese foi baseada numa colecção de isolados de Bcc colhidos no Hospital de Santa Maria (HSM), em Lisboa/Portugal, de pacientes de FQ clinicamente infectados. Estes isolados foram previamente caracterizados ao nível da espécie e diferenciados ao nível da estirpe, com base nos ribotipos obtidos por métodos moleculares estabelecidos. Cento e oitenta e cinco isolados, representantes de quatro diferentes espécies de Bcc (*Burkholderia cepacia*, *Burkholderia cenocepacia* (recA linhagens IIIA e IIIB), *Burkholderia multivorans* e *Burkholderia stabilis*) e quinze ribotipos estavam disponíveis para análise.

Foi abordada a metodologia FTIR para a diferenciação de isolados clínicos de Bcc ao nível da espécie e do ribotipo utilizando uma análise quimiométrica. A diferenciação ao nível da espécie levou a valores de classificação incorrecta de 10 % para os isolados do HSM. Para o conjunto de teste, composto pelas estirpes de referência, foi obtido um pior resultado (32 % de más classificações), indiciando algumas limitações do método para a diferenciação ao nível da espécie. Quanto à discriminação de acordo com os ribotipos, os resultados para *B. cepacia*, *B. cenocepacia* recA linhagens IIIA e IIIB, mostraram valores de taxas de classificação incorrecta de 4 %, 2 % e 8 % respectivamente. Estes resultados forneceram uma indicação de que o método baseado em FTIR pode ter um melhor desempenho em espécies fortemente relacionadas, o que levou à decisão de restringir a análise a um conjunto de estirpes muito relacionadas. Com esse objetivo, foi realizada a avaliação fenotípica de onze isolados de *B. cenocepacia*, obtidos em consultas periódicas de acompanhamento de um único paciente de FQ cronicamente infectado. A natureza clonal dos isolados foi confirmada com base no perfil de sequências de "multilocus" (MLST). A caracterização fenotípica incluiu ensaios de sensi-

bilidade a diferentes classes de agentes antimicrobianos (ceftazidima, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacina, imipenemo e sulfametoxazol-trimetoprim), motilidade celular, hidrofobicidade celular, potencial zeta, dimensão das colónias, morfologia celular, composição de ácidos gordos, condições de crescimento sob limitação e sob saturação de ferro, produção de exopolissacarídeos e tamanho dos biofilmes formados. Para a maioria das características testadas, em particular para os níveis de susceptibilidade antimicrobiana, nenhum padrão consistente de alteração dependente do tempo pode ser identificado. No entanto, os resultados sugerem uma notável expansão clonal durante o tempo de colonização. As propriedades do isolado que iniciou a infecção diferem significativamente das obtidas para os isolados recolhidos durante o curso da infecção. Isto poderá estar relacionado com a administração de antibióticos por terapia intravenosa em períodos de tempo específico. A susceptibilidade antimicrobiana e nomeadamente a mobilidade "swarming" para o primeiro isolado foram consistentemente mais elevados em comparação com os obtidos para os restantes isolados. Os valores mais baixos verificados para o potencial zeta e eficiência de crescimento sob limitação de ferro foram registados para este mesmo isolado. A avaliação do método FTIR para diferenciar estes onze isolados foi realizada por meio de testes com condições distintas de crescimento (meios de cultura, tempo de crescimento e das condições de (micro)aerofilia). Os efeitos dessas condições sobre os espectros de FTIR foram inicialmente avaliadas e os resultados demonstraram essencialmente que a maior variabilidade espectral foi capturada em culturas de 48h, quando comparadas às culturas de 13 e 24h, independentemente dos meios utilizados. A capacidade do método de FTIR para diferenciar estes isolados, foi verificada com sucesso independentemente do meio de crescimento. As réplicas biológicas dos isolados crescidos em microaerofilia demonstraram baixo nível de reprodutibilidade pelo que a utilização desta técnica de crescimento para análises de espectroscopia FTIR é de limitada aplicação. Observou-se através da análise de componentes principais, que a estrutura obtida para os onze isolados a partir dos espectros FTIR, seguiu um padrão semelhante, quando comparada aos resultados dados pelos fenótipos. Os espectros FTIR dos isolados cultivados em condições de aerofilia com diferentes meios e diferentes tempos de crescimento foram modelados por regressão por mínimos quadrados parciais face aos diferentes fenótipos. Os resultados indicam que os espectros FTIR podem ser usados para avaliar muitos dos fenótipos analisados. A produção de exopolissacarídeos, tamanho de colónias, morfologia das células e a mobilidade "swarming" apresentaram os melhores resultados. Os resultados indicam que os meios de cultura e tempo de crescimento são parâmetros fundamentais que condicionam os resultados da aplicação desta metodologia (neste caso, o crescimento em PIA durante 48 horas gerou os melhores resultados).

Globalmente, esta tese demonstra a utilidade do método baseado em espectroscopia FTIR como ferramenta para a diferenciação rápida e caracterização fenotípica de bactérias do Bcc. O seu desempenho foi especialmente bom para as bactérias intimamente relacionadas (mesma espécie e mesmo ribotipo). A metodologia proposta apresenta várias vantagens, tais como a simplicidade, baixo custo por análise, flexibilidade, preciso e baixo tempo por análise. Este trabalho também produziu pistas importantes sobre as estratégias da *B. cenocepacia* em termos de persistência durante a progressão da doença pulmonar FQ.

**Palavras chave:** Complexo *Burkholderia cepacia*, Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, Quimiometria, Fibrose quística, Diferenciação de bactérias.