

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN *BURKHOLDERIA CEPACIA*
KOMPLEKSİNİN
PCR TABANLI İDENTİFİKASYONU**

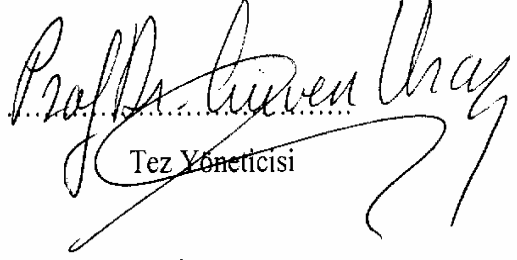
Dilek Hande BİNNET

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2006
ANKARA**

Dilek Hande BİNNET tarafından hazırlanan KLİNİK ÖRNEKLERDEN
BURKHOLDERIA CEPACIA KOMPLEKSİNİN PCR TABANLI
İDENTİFİKASYONU adlı bu tezin doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

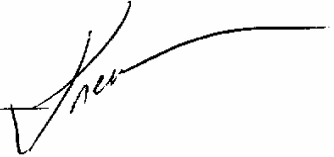

Tez Yöneticisi

Bu çalışma jürimiz tarafından BİYOLOJİ Anabilim
Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

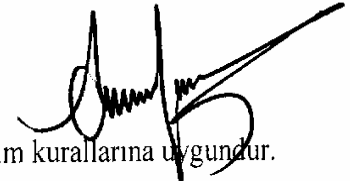
Başkan : Prof. Dr. Nejat AKAR 

Üye : Danışman Prof. Dr. Cüven Uraz

Üye : Prof. Dr. Leyla AÇIK & AÇIK

Üye : Prof. Dr. Nevio KESKİN 

Üye : Prof. Dr. Cumhur GÖKMİŞ 


Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN *BURKHOLDERIA CEPACIA* KOMPLEKSİNİN
PCR TABANLI İDENTİFİKASYONU**

(Doktora Tezi)

Dilek Hande BİNNET

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ocak 2006

ÖZET

Son yıllarda *Pseudomonas* ve *Burkholderia cepacia* kompleks etkenlerinin belirlenmesinde moleküler tanı yöntemlerinin kullanılması önem kazanmıştır. Araştırmada 97 klinik örnekten *B. cepacia* kompleksin moleküler identifikasyonu yapılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ile 97 izolatın 28'inde *B. cepacia* kompleks için özel olan 770 baz çift (bp)'lik 16S rRNA gen bölgesi çoğaltılmıştır. *B. cepacia* kompleks PCR ürünleri TaqI, RsaI ve Tsp509I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile doğrulanmıştır. Çalışmada restiriksiyon endonükleaz enzimleri ile doğrulanan izolatların nükleotid dizilerinin belirlenmesi hedeflenmiş ve örneklerle DNA dizi analizi uygulanmıştır. *B. cepacia* kompleks izolatlarının DNA dizi analizi ile belirlenen nükleotid dizisi, gen kütüphanesine kayıtlı AY207313 nükleotid dizisi ile karşılaştırılmıştır. Her iki nükleotid dizisinin birbirinin aynı olduğu tespit edilmiştir. 28 *B. cepacia* kompleks izolatına moleküler bant yapılarının tespiti için rastgele seçilen primerle PCR (AP-PCR) uygulanmıştır ve örnekler 6 gruba dağılmıştır. AP-PCR ürünlerinin oluşturduğu bantların sayı ve büyüklüğünü tespit etmek için ürünlere DNA biyoanalizi uygulanmıştır. DNA biyoanaliz sonuçlarının grafik,

jel ve sayısal değerlendirmeleri sonucunda *B. cepacia* kompleks izolatları 11 gruba ayrılmıştır ve her grubun DNA bant büyüklüklerinin sayısal sonuçları elde edilmiştir. Çalışmada *B. cepacia* kompleks izolatlarının identifikasyonunda moleküler yöntemlerin önemi vurgulanmış ve. mikroorganizmaların identifikasyonu için geleneksel kültür yöntemlerinin yanında moleküler yöntemlerinde kullanılması tavsiye edilmiştir.

Bilim Kodu : 203.1.104
Anahtar Kelimeler : *Burkholderia cepacia* kompleks, PCR, identifikasyon, DNA biyoanalizi, AP-PCR
Sayfa Adeti : 84
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Güven Uraz

**PCR-BASED DETECTION AND IDENTIFICATION OF
BURKHOLDERIA CEPACIA COMPLEX FROM CLINICAL SPECIMENS**

(PhD. Thesis)

Dilek Hande BINNET

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

January 2006

ABSTRACT

Molecular identification methods have gained importance at detection of both *Pseudomonas* genus and *Burkholderia cepacia* in recent years. During the research, molecular identification of *B. cepacia* complex from 97 clinical specimens were studied. 770 base pair (bp) 16S rRNA gene region specific for *B. cepacia* complex had been amplified by PCR. The PCR products of *B. cepacia* complex were verified using, TaqI, RsaI and Tsp5091 restriction endonucleases enzymes. In this study, determination of nucleotide sequence of strains which were verified with restriction endonucleases enzymes had been aimed and DNA sequence analysis of specimens were applied. The nucleotide sequence which was defined as a result of DNA sequence analysis of verified *B. cepacia* complex isolates compared with *B. cepacia* complex (AY207313) nucleotide sequence which registered in GenBank. At the end of comparison, nucleotide sequences, was found to carry the same sequence with the previously submitted sequence. As consequence of AP-PCR method which was used for molecular typing of 28 *B. cepacia* complex isolates and the specimens are separated into 6 different bands. In order to determine the numbers and

greatness of bands which caused by amplifying fragments, DNA bioanalysis process was applied to the fragments. At the end of this analysis it was detected that same fragments are separated into 11 different groups. According to our study results, molecular methods in *B. cepacia* complex identification were confirmed and verified as more confident and faster tests. Due to these specifications molecular methods are also advised in addition to traditional culture methods for clinical research laboratories.

Science Code : 203.1.104

Key Words : *Burkholderia cepacia* complex, identification, DNA bioanalysis, PCR, AP-PCR

Page Number : 84

Adviser : Prof. Dr. Güven Uraz

TEŞEKKÜR

Moleküler biyoloji konusunda araştırma yapmanın teknik ve maddi imkanlardan dolayı oldukça zor olduğu ülkemiz koşullarında, bana bu olanakları sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen eğitim ve bilim ordusuna bağlı değerli bilim insanlarından; Yüksek Lisans'tan beri yanımda olan bana yol gösteren, her türlü desteğini esirgemeyen Doktora eğitimim için olanak sağlayan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Güven Uraz'a ,

Moleküler patoloji ve genetik dalında ülkemizin en güvenilir laboratuvarından birinde bana çalışma olanağı sağlayan, moleküler tanı yöntemlerini öğreten ve maddi , manevi desteklerini esirgemeyen A.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Nejat Akar'a, araştırmam süresince bilmediğim her konuda danışabildiğim, deneyim ve bilgilerini esirgemediğim benimle paylaşan sevgili ablam Uzm. Bio. Ece Akar'a,

Birlikte çalışmaktan çok büyük mutluluk duyduğum ve çalışma ortamını benimle paylaşarak ,her konuda destek veren sevgili arkadaşım Uzm. Dr. Zeynep Ceren Karahan'a,

Bakteri örneklerimin temininde her türlü kolaylığı gösteren A.Ü. Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı Sorumlusu Prof. Dr. Derya Aysev'e ve Uzm. Dr. Haluk Güriz'e ve de tüm laboratuvar çalışanlarına, Moleküler patoloji ve genetik laboratuvarı çalışanlarından Uzm. Bio. Duygu Özel'e ve tüm çalışma arkadaşlarıma, Ve yine suşların temininde bana yardımcı olan G.Ü. Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi sevgili arkadaşım Prof. Dr. Esin Şenol'a,

Tezimi hazırladığım süreç içerisinde bana hep destek olan, yol gösteren, sıkıntılarımı paylaşan sevgili eşime, biricik kızıma ve aileme; teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Pseudomonas</i> Genusu	2
1.1.1. <i>Pseudomonas</i> genusunun kültür özellikleri	4
1.1.2. <i>Pseudomonas</i> ve yakın cinslerin identifikasyonu için ortak özellikler	5
1.1.3. <i>Pseudomonas</i> genusunun yaptığı hastalıklar	6
1.2. <i>Burkholderia cepacia</i> Hakkında Genel Bilgi	7
1.2.1. <i>Burkholderia cepacia</i> kompleksinin taksonomisi	7
1.2.2. <i>Burkholderia cepacia</i> kompleks	9
1.3. Kullanılan Moleküler Teknikler Hakkında Genel Bilgiler	16
1.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu	16
1.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonunun kullanım alanları	17
1.4. Moleküler Tiplendirme	19
1.4.1. Moleküler tekniklerin enfeksiyon hastalıklarında kullanım alanı	19

	Sayfa
1.4.2. Rastgele seçilen primerle yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) Arbitrarily primed polimeraz zincir reaksiyonu) hakkında genel bilgi	21
1.5. DNA Dizi Analizi	22
1.6. DNA Biyoanalizi.....	23
1.6.1. DNA biyoanalizin avantajları	24
2. MATERYAL METOT	25
2.1. <i>Pseudomonas spp.</i> ve <i>B.cepacia</i> Kompleks Bakterilerinden DNA İzolasyonu	26
2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	27
2.2.1. Tris-EDTA	27
2.2.2. Tris-HCl	27
2.2.3. Sodyum asetat	27
2.2.4. EDTA	27
2.2.5. 5x TBE	28
2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	28
2.3.1. PCR karışımı	28
2.3.2. DNA ilavesi.....	29
2.3.3. PCR programı	29
2.3.4. PCR ürünlerinin görüntülenmesi	29
2.4. Örneklerin Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Doğrulanması	29
2.4.1. <i>Tsp509I</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile inkübasyon	30
2.4.2. <i>TaqI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile inkübasyon.....	30
2.4.3. <i>Rsa I</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile inkübasyon	30

	Sayfa
2.4.4. Elde edilen ürünlerin görüntülenmesi	30
2.5. Rastgele Seçilen Primerle Polimeraz Zincir Reaksiyonu (AP-PCR).....	31
2.5.1. AP-PCR karışımı.....	32
2.5.2. AP-PCR programı	32
2.6. Poliakrilamid Jelin Hazırlanması	32
2.6.1. Stok çözeltileri	32
2.7. Gümüş Nitrat Boyama İşlemi	33
2.7.1. %1'lik gümüş nitrat.....	33
2.7.2. %15'lik sodyum hidroksit.....	33
2.7.3. %7,5'luk disodyum karbonat	33
2.8. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi.....	34
2.9. DNA Dizi Analizi	35
2.10. DNA Analizi- Biyoanaliz.....	36
2.10.1. Jel karışımı	36
2.10.2. DNA analizi boya konsantresi	36
2.10.3. DNA analiz jeli	36
2.11. İstatiksel Analiz.....	37
3. DENEYSEL BULGULAR	38
3.1. Hasta Örneklerinden İzole Edilen <i>B.cepacia</i> Kompleks İzolatlarının Dağılımı	38
3.2. <i>B.cepacia</i> Kompleks İzolatlarının PCR İdentifikasyonu	39
3.3. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Örneklerin Doğrulanması.....	42
3.3.1. <i>Taq I</i> restriksiyon endonükleaz enzim sonuçları.....	42
3.3.2. <i>Rsa I</i> restriksiyon endonükleaz enzim sonuçları.....	43

	Sayfa
3.3.3. <i>Tsp509I</i> restriksiyon endonükleaz enzim sonuçları	43
3.4. DNA Dizi Analizi	44
3.5. AP-PCR İle 28 <i>B.cepacia</i> Kompleks İzolatlarının Bant Yapısı.....	45
3.6. <i>B.cepacia</i> Kompleks İzolatlarının AP-PCR Ürün Biyoanalizi	47
3.7. İstatistiksel Analiz.....	63
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ.....	84

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. <i>Pseudomonas</i> genusu ve onlara yakın bakterilerin rRNA homoloji gruplarıyla sınıflandırılması	3
Çizelge 1.2. Son yıllarda isimleri değiştirilen <i>Pseudomonas</i> türlerinin yeni tür isimleri	4
Çizelge 1.3. Bazı <i>Burkholderia</i> türlerinin biyokimyasal özellikleri	8
Çizelge 1.4. <i>B. cepacia</i> kompleksde yer alan genomvarların biyokimyasal özellikler	8
Çizelge 3.1. Çeşitli hasta kültürlerinden izole edilen <i>Pseudomonas spp.</i> ve <i>B. cepacia</i> kompleks izolatının dağılımı	38
Çizelge 3.2. 28 <i>B. cepacia</i> kompleks izolatının AP-PCR ve biyoanalizör analizi bant büyüklük sonuçlarının karşılaştırılması.....	50
Çizelge 3.3. Biyoanalizör analizinde kullanılan markerın bant büyüklüğü, konsantrasyonu ve molaritesi.....	51
Çizelge 3.4. A grubu olarak adlandırılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının bant (bç) ölçüm sonuçları.....	51
Çizelge 3.5. B grubu olarak adlandırılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının bant (bç) ölçüm sonuçları.....	53
Çizelge 3.6. C grubu olarak adlandırılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının bant (bç) ölçüm sonuçları.....	54
Çizelge 3.7. D grubu olarak adlandırılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının bant (bç) ölçüm sonuçları.....	55
Çizelge 3.8. E grubu olarak adlandırılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının bant (bç) ölçüm sonuçları.....	56
Çizelge 3.9. F grubu olarak adlandırılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının bant (bç) ölçüm sonuçları.....	57
Çizelge 3.10. G grubu olarak adlandırılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının bant (bç) ölçüm sonuçları.....	58
Çizelge 3.11. H grubu olarak adlandırılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının bant (bç) ölçüm sonuçları.....	59

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.12. I grubu olarak adlandırılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının bant (bç) ölçüm sonuçları.....	60
Çizelge 3.13. J grubu olarak adlandırılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının bant (bç) ölçüm sonuçları.....	61
Çizelge 3.14. K grubu olarak adlandırılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının bant (bç) ölçüm sonuçları.....	62
Çizelge 3.15. Çeşitli hasta kültürlerinden izole edilen <i>Pseudomonas spp.</i> ve <i>B. cepacia</i> kompleks dağılımı	64

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. PCR'nin şematik görünümü.....	21
Şekil 1.2. AP-PCR işlemi ve tek bir kısa primer ile çoğaltılan DNA'nın elektroforez görüntüsü şematize edilmiştir.....	22
Şekil 2.1. <i>B. cepacia</i> kompleksin 770 bp'lik geninin <i>Taq I</i> , <i>Rsa I</i> ve <i>Tsp 509I</i> restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim yerleri	31
Şekil 3.1. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile doğrulanan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının DNA dizisi sonucu	46
Şekil 3.13. 3 ve 9 nolu <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü	52
Şekil 3.14. 1, 4, 5, 6, 19, 20 ve 21 nolu <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü	53
Şekil 3.15. 8 ve 26 nolu <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü	54
Şekil 3.16. 2 ve 7 nolu <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü	55
Şekil 3.17. 11 ve 16 nolu <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü	56
Şekil 3.18. 13, 14 ve 22 nolu <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü	57
Şekil 3.19. 10 ve 15 nolu <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü	58
Şekil 3.20. 12 ve 23 nolu <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü	59
Şekil 3.21. 17 ve 27 nolu <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü	60
Şekil 3.22. 18 ve 25 nolu <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü	61
Şekil 3.23. 24 ve 28 nolu <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü	62

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Ethidyum bromid ile boyanarak UV. altında görüntülenmiş <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının klasik-fenol kloroform yöntemi ile izole edilen DNA görüntüsü(%1 agaroz jel).....	38
Resim 3.2. PC480-PC1250 sentetik oligonükleotid primerleri ile çoğaltılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının PCR ürünü ethidyum bromid ile UV altında görüntülenmiştir (%1 agaroz jel)	40
Resim 3.3. PC480-PC1250 sentetik oligonükleotid primerleri ile çoğaltılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının PCR ürünü ethidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiştir (%1 agaroz jel)	41
Resim 3.4. PC480-PC1250 sentetik oligonükleotid primerleri ile çoğaltılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının PCR ürünü ethidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiştir (%1 agaroz jel)	41
Resim 3.5. PC480-PC1250 sentetik oligonükleotid primerleri ile çoğaltılan <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının PCR ürünü ethidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiştir (%1 agaroz jel)	42
Resim 3.6. Ethidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının <i>TaqI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi (%2 agaroz jel)	43
Resim 3.7. Ethidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının <i>Taq I</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi (%2 agaroz jel)	43
Resim 3.8. Ethidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının <i>Rsa I</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi (%2 agaroz jel)	44
Resim 3.9. Ethidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının <i>Tsp 509I</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi (%2 agaroz jel)	45
Resim 3.10. Gümüş boyama ile görüntülenen <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının AP-PCR ürünleri.....	47
Resim 3.11. Gümüş boyama ile görüntülenen <i>B. cepacia</i> kompleks izolatlarının AP-PCR ürünleri.....	47
Resim 3.12. AP-PCR ürünlerin biyoanalizör analizi (Agilent Technologies, ABD) jel görüntüsü	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı kısaltmaların açıklamaları aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
AP-PCR	Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction
<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
Bç	Baz çifti
CF	Kistik Fibroz
DAF	DNA amplification fingerprinting
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Disodyum ethilenediaminetetraacetat
FlhC	Flagellin geni
M – PCR	Multipleks PCR
OF	Oksidasyon fermentasyon
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. cepacia</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>
PAGE	Polyacrylamid Gel Electrophoresis
PCR	Polmerase Chain Reaction
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RT-PCR	Real - Time PCR
spp.	Subspecies
TBE	Trisma-base
TE	Tris- EDTA
TSI	Triple Sugar Iron Agar
UV	Ultra viyole

1.GİRİŞ

Son yıllarda mikrobiyolojide cins ve tür seviyesinde bilinen birçok bakterinin isimlendirilmesinde değişimler meydana gelmektedir. Bu durum günümüzde DNA ve RNA bazlı çalışmaların yapılmasıyla hız kazanmıştır. Epidemiyolojik araştırmalar açısından enfeksiyon etkeninin moleküler olarak tiplendirilmesi ve enfeksiyon kontrol metotlarının geliştirilebilmesi oldukça önem taşımaktadır. Ribozomal dizilerin kullanımına dayalı olarak yapılan moleküler tiplendirme (genotiplendirme); uygulamanın kolay olması, güvenilir sonuç vermesi, çok sayıda suşa uygulanabilir olması ve suşları birbirinden ayırt edebilmesi sayesinde pek çok bakteriyel patojenin tiplendirilmesinde kullanılmaktadır. Ribozomal dizilerin kullanılması ile yapılan moleküler tiplendirme *Pseudomonas* ve *Burkholderia* suşlarının genotiplendirmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Günümüzde her yaş grubunda sıklıkla rastladığımız akciğer enfeksiyonlarında, kronik bakteriyel kolonizasyonlu kistik fibroz hastalarında hastalık ve ölüm oranını arttıran temel nedenlerden birini oluşturan bakteriler arasında *Burkholderia cepacia* da yer almaktadır. Daha önceleri yapılan klinik çalışmalarda özel bir öneme sahip olduğu belirtilmeyen *B. cepacia* kompleks günümüzde virulansındaki yükseklik ve yaptığı enfeksiyon sayısındaki artışlar sebebiyle oldukça önem kazanmıştır. Ancak halen bazı araştırmacılar tarafından identifikasyon aşamasında *B. cepacia* kompleksi göz ardı edilmektedir ve bu sebepten dolayı klinikte *B. cepacia* kompleksi izolasyonuna az rastlanılmaktadır. Azınlıkla ifade edilebilecek derecede etkenin az sayıda izole ediliyor olması bu etkenin *Pseudomonas* ailesi içerisinde değerlendirilmesinden kaynaklanmaktadır. *B. cepacia* ilk olarak 1950'li yıllarda Burkholder tarafından çiçek soğanında bakteriyel çürümeye sebep olan bakteri olarak tanımlanmıştır ve bu bakteri o zamanlarda *Pseudomonas cepacia* olarak adlandırılmıştır (1). 1981 yılına kadar *P. cepacia* ismi Onaylanmış Bakteri isimleri listesinde yerini alamamıştır (2). 1981 yılında Palleroni ve Holmes tarafından yeniden gündeme getirilen bu bakteri DNA homolojilerine göre yeni bir cins olan *Burkholderia* genusuna transfer edilmiştir (3, 4). *B. cepacia* kompleks üyelerinin her biri şimdi resmi bir örnek ismine sahiptir. Bu isimler önceki genomvar

tanımlamasının terminolojide yerine geçen sistem ismidir ve *B. cepacia* kompleks olarak kullanılmaktadır (5).

Görüldüğü gibi etkenin moleküler yöntemlerle tanımlanması, kısa sürede güvenilir sonuçların alınmasına ve hastanın mikrobiyolojik tanısının neredeyse örneğin alındığı gün içerisinde tespit edilmesine imkan vermektedir. Moleküler tiplendirmede kullanılan yöntemler sonucunda enfeksiyon etkeninin epidemiyolojisinin belirlenmesi uygun tedavinin sağlanması açısından oldukça önem taşımaktadır. Kullanılan moleküler yöntemlerin rutin çalışma laboratuvarlarına uygulanabilmesi için, yöntemin kolay, maddi yükünün düşük ve ayırım gücünün yüksek olması gerekir. Çalışmada kullanılan tüm yöntemler aranan bu özellikleri karşılayan ve kullanımı tüm dünya laboratuvarlarında yaygınlaşan yöntemlerdir. Bu verilere dayanarak araştırmamızda *Pseudomonas spp.* olarak çeşitli kliniklerde adlandırılması yapılan suşlar arasında moleküler tekniklere dayanarak *B. cepacia* kompleks suşlarının identifikasyonu ve *B. cepacia* kompleks suşlarının moleküler tiplendirmesi çalışılmıştır.

1.1. *Pseudomonas* Genusu

Pseudomonadaceae ailesindeki *Pseudomonas* cinsinde suda ve toprakta yaşayan gram negatif, nonfermentatif, aerobik basillerin bulunduğu çeşitli türler yer almaktadır. Çizelge 1.1’de gösterildiği gibi bu cinste bulunan bakteriler rRNA homolojisine göre beş gruba ayrılmıştır. Son yıllarda yapılan ayrıntılı çalışmalara göre *Pseudomonas* cinsinin yeniden sınıflandırılması söz konusu olmuştur. Buna göre Homoloji grup I’de bulunan yedi tür homoloji grup II’ye aktarılıp bu grupta incelenmesi yapılmaktadır. *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia picketti*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia caryophyllii* ve *Burkholderia solanacearum* homoloji grup II’ye aktarılanlardır. Bu türlerden ilk 5’i insanlardan izole edilmektedir.

Çizelge1.1. *Pseudomonas* genusu ve onlara yakın bakterilerin rRNA homoloji gruplarıyla sınıflandırılması (6)

rRNA Homoloji grup ve alt grupları	Cins ve Türler
I- Flouresan grup	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Pseudomonas putida</i>
Flouresan olmayan grup	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	<i>Pseudomonas mendocina</i>
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
II	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Burkholderia mallei</i>
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
	<i>Burkholderia picketti</i>
III	<i>Comamonas acidovorans</i>
	<i>Comamonas testosteroni</i>
IV	<i>Pseudomonas diminuta</i>
	<i>Pseudomonas vesicularis</i>
V	<i>Xantomonas maltophila</i>

Son yıllardaki ayrıntılı çalışmalar sonucunda *Pseudomonas* cinsi yeniden sınıflandırılmıştır. *Pseudomonas* cinsi içerisinde bazı mikroorganizmaların yeri rRNA homolojisine göre yer değiştirmiştir ve yeniden sınıflandırılmıştır. Yeni yapılan sınıflandırma sonuçları Çizelge 1.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 1.2. Son yıllarda isimleri değiştirilen *Pseudomonas* türlerinin yeni tür isimleri (6)

ESKİ İSİMLENDİRME	YENİ İSİMLENDİRME
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>Pseudomonas gladioli</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>
<i>Pseudomonas mallei</i>	<i>Burkholderia mallei</i>
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
<i>Pseudomonas picketii</i>	<i>Burkholderia picketii</i>
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	<i>Comamonas acidovorans</i>
<i>Pseudomonas testosteroni</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>
<i>Pseudomonas delafieldii</i>	<i>Acidovorax delafieldii</i>
<i>Pseudomonas facilis</i>	<i>Acidovorax facilis</i>
<i>Pseudomonas temperans</i>	<i>Acidovorax temperans</i>
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	<i>Shewanella paucimobilis</i>
<i>Pseudomonas mesophilica</i>	<i>Methylobacterium extorquens</i>
<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Chrysemonas luteola</i>
<i>Pseudomonas oryzae</i>	<i>Flovimonas oryzae</i>

1.1.1. *Pseudomonas* Genusunun kültür özellikleri

Pseudomonas'ların organik üreme faktörlerine ihtiyacı yoktur. Otuzdan fazla organik maddeyi üremek için kullanabilir. Zorunlu aerobtur. En iyi 37°C'de üreyebilir. *P. aeruginosa* ve diğer bazı türler maksimum 42°C'de üreyebilir fakat +4°C'de üreyemezler. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında çok kullanılan besiyerlerinde kolayca ürediklerinden izolasyonları oldukça basittir. Çoğu izolatlar kanlı agarda beta hemolitik ve tipik yeşil metalik parlaklık oluşturur. Bu görünüm Piyosyanin pigmentine bağlıdır. MacConkey agarda mavi-yeşil koloni oluşturur. İzolasyon için besiyerleri 24-48 saat 37°C'de inkübe edilmelidir. *P. aeruginosa* gram negatif identifikasyon sistemleri ile otomatize olarak identifiye edilebilir. Ancak bu sistemlerin haricinde piyosyanin varlığı *P. aeruginosa* için özgün ayırıcı bir

özelliğidir. Kültüründeki tatlı üzüm benzeri koku özelliği *P. aeruginosa*'yı kolayca identifiye etmede aynı derecede özgündür (7).

1.1.2. *Pseudomonas* ve yakın cinslerin identifikasyonu için ortak özellikleri

- Gram negatif, sporsuz, düz veya hafif kıvrık basil veya kokobasildir.
- *Burkholderia mallei* hariç kutupsal tek veya birbirinden çok kirpik ile hareketlidir.
- Genellikle MacConkey agarda iyi ürer.
- Zorunlu aerobtur.
- Glikozlu oksidasyon fermentasyon (OF) besiyerinin açık tüpünde asit oluşturur, gaz oluşturmaz.
- Glikozlu OF besiyerinin kapalı tüpünde asit oluşturmaz.
- Karbonhidrat hidratları oksitler.
- Oksidaz reaksiyonları çoğu suşlarda pozitifdir.
- Katalaz enzimine sahiptir.
- İndol reaksiyonu negatifdir.
- TSI'de reaksiyon oluşturmaz. (dik ya da yatık kısmında asit oluşturmaz.)
- Flouresan ve flouresan olmayan pigmentler yapabilir.
- Aminoglikozidler, sefalosporinler, imipenem ve penisilinler gibi çeşitli antibiyotiklere dirençli suşları oldukça fazladır (8).

1.1.3. *Pseudomonas* genusunun yaptığı hastalıklar

Doğada çok yaygın olarak bulunan *Pseudomonas*'lar organik materyallerin yeniden düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Çoğu türler bitki ve hayvanlar için patojendir. Fakat *Pseudomonas*'ların çoğu insanları infekte etmekle birlikte aralarından bazıları özellikle savunma sistemleri kırılmış bireyler için önemli fırsatçı patojeni oluşturmaktadır. Konağın savunma sisteminin kırılmış olması ve bakterilerin sık kullanılan birçok antibiyotiğe karşı dirençli oluşu sebebiyle *Pseudomonas* enfeksiyonlarının genellikle tedavisi ağır ve zordur. *Pseudomonas* cinsinde sıklıkla izole edilen insan patojeni *P. aeruginosa*'dır. Özellikle fırsatçı patojen olarak bilinen *P. aeruginosa*'nın *Pseudomonas*lar arasında çok önemli bir yeri vardır. İnsanlarda sık rastlanan bir saprofitir. *Pseudomonas* bağlı olarak gelişen hastalık normal konak

savunmasının değişmesiyle başlar. Deri ve mukozaların bütünlüğünün bozulmasında damar içi veya üriner katater varlığında kişide hastalık gelişebilir. Ayrıca bağışıklık sistemi baskılandığı durumlarda da *Pseudomonas* enfeksiyonlarına zemin hazırlanır. *P. aeruginosa*'nın farklı fiziki koşullara uyum sağlayabilmesi, beslenme gereksinmelerinin azlığı ve antibiyotiklere karşı kolay direnç kazanabilmesi patojenliğe katkıda bulunur. Aynı zamanda fırsatçı bir patojen olarak kabul edilen *P. aeruginosa*'nın insanlarda sebep olduğu enfeksiyonların son yıllarda hastane ortamında gittikçe arttığı ve bakterilerin bu ortamda çok kolay barındığı ve dirençli suşların bir hayli arttığı gözlenmektedir.

P. aeruginosa hastane kaynaklı enfeksiyonların başında gelmektedir, bu sebeple yoğun bakım ünitelerinde büyük dikkat gerekmektedir (9).

Yanık hastalarının mekanik olarak solunumu sağlandığı zaman *P. aeruginosa* tarafından enfeksiyona yakalanma riski oldukça büyüktür (10).

P. aeruginosa patojenler arasında mortaliteyi arttırıcı büyük rol oynar, özellikle immünsüpresif hastalar, travmatik yaralar, yanık, kanser ve kistik fibroz da mortalitede artışa sebep olmaktadır (11).

P. aeruginosa diğer gram negatif nonfermenter basillerden *B. cepacia* kompleksi, *Stenotrophomonas maltophila* ve *Alcaligenes xylosoxidans* gibi Kistik Fibrozlu hastalarda akciğer enfeksiyonlarına sebep olmaktadır (12).

Çoğu kistik fibroz hastalarında öldürücü akciğer enfeksiyonlarına *P. aeruginosa* sebep olmaktadır Yanık hastalarında ve travmatik yaralanmalarda bakteriyel enfeksiyon çok çabuk meydana gelebilir ve kontrolü oldukça zordur. Sepsis bu tip hastalarda genellikle öldürücüdür. Son yıllarda bakteri enfeksiyonuna sebep olan hastane kaynaklı gram negatif bakterilerin başında *P. aeruginosa* gelmektedir (13).

Pseudomonas'ların diğer yol açtığı önemli enfeksiyonlar arasında endokardit, solunum yolu enfeksiyonları, bakteriyemi, merkezi sinir enfeksiyonları, kulak

enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, üriner enfeksiyonlar, gastrointestinal enfeksiyonlar, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları yer almaktadır (14).

1.2. *Burkholderia cepacia* kompleks Hakkında Genel Bilgi

1.2.1. *Burkholderia cepacia* kompleks taksonomisi

Son yıllarda 16S rRNA dizileri, DNA-DNA homologik değerleri, hücresel lipit ve yağ asitlerinin yapısı, fenotipik karakterlere dayanan araştırmalar sonucunda *Burkholderia*'lar *Pseudomonas* ailesi içinden ayrılarak yeni bir grup haline getirilmiştir (15). *Burkholderia*'ların 28 tür içerdiği bilinmektedir (16, 17, 18, 19).

Bu türler sırası ile: *B. cepacia*, *B. vietnamiensis*, *B. multivorans*, *B. pyrrocinia*, *B. stabilis*, *B. amfifaria*, *B. gladioli*, *B. plantarii*, *B. glumae*, *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. andropogonis*, *B. caryophyllii*, *B. graminis*, *B. fungorum*, *B. caribensis*, *B. phenazinium*, *B. glathei*, *B. kururiensis*, *B. cocovenenans*, *B. narimbergensis*, *B. pickettii*, *B. sacchari*, *B. solanacearum*, *B. vandii*, *B. ubonensis*, *B. caledonia*'dır.

Çizelge 1.3. Bazı *Burkholderia* türlerinin biyokimyasal özellikleri (6)

	<i>B.mallei</i>	<i>B.pseudomallei</i>	<i>B.cepacia</i>	<i>B.picketti</i>
Hareket	-	+	+	+
Hücre dışı	-	-	+	D
Pigment üretimi				
Hücre içi	-	+		
pigment üretimi				
Arginin dihirolaz	+	+	-	-
Denitrifikasyon	+	+	-	+
Oksidaz	+	+	+	+
Jelatin hirolizi	+	+	D	-
Nişasta hidrolizi	D	+	-	-
41°C'de üreme	+	+	+	+

Çizelge 1.4. *B. cepacia* kompleksde yer alan genomvarların biyokimyasal özellikleri

Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+
Sukroz	V	-	V	-	+	-	+
Adonitol	V	+	V	V	-	+	+
Laktoz	V	+	V	+	+	+	+
Lizin	+	V	+	+	+	-	+
dekarboksilaz							
Ornitin	V	-	V	+	-	-	-
dekarboksilaz							
Jelatin	V	-	V	+	-	-	+
Eskulin	V	-	V	-	-	-	V
â-Galactosidaz aktivitesi	+	+	+	-	+	+	+
42°C'de üreme	V	+	V	-	+	+	V
â -hemoliz	-	-	-	-	V	-	V
	genomvar	genomvar	genomvar	genomvar	genomvar	genomvar	genomvar
	I	II	III	IV	V	VI	VII
+ : %90 pozitif reaksiyon - : %10'dan düşük pozitif reaksiyon V : %10-%90 arası pozitif reaksiyon (20)							

1990'ların ortalarında bazı araştırmacılar farklı ekolojik hücrelerden izole edilen *B. cepacia* kompleks türlerinin arasında bir heterojenlik olduğunu tespit etmişlerdir. Bu türler geçici olarak varolan tekniklerle sınıflandırılmıştır (21, 22). *B. cepacia* kompleks izolatları arasındaki heterojenlik doğru identifikasyonu problemli hale getirir ve tekniklerin değerlendirilmesi, duyarlı ve belirgin olmadıklarını ya da ne duyarlı ne de belirgin olduklarını göstermiştir (23, 24, 25).

B. cepacia kompleks türleri arasında farklılık ve doğru identifikasyon planları Vandamme ve arkadaşlarının kistik fibroz hastalarından izole edilen türler için kullanılmıştır. Bu çalışmalar araştırmacıları *B. cepacia* kompleks türlerini gösteren çok aşamalı taksonomik bir araştırma yapmaya yönlendirmiştir. *B. cepacia* kompleks genomvar V daha önce *B. vietnamiensis* olarak izole edilmiştir ve aynı zamanda pirinç kökünde nitrojeni sabitlediği rapor edilmiştir (22). *B. cepacia* kompleks genomvar II *B. multivorans* ve genomvar IV *B. stabilis*'dir (26, 27).

B. cepacia kompleksi genomvar I'de taksonomik olarak adlandırılmış *B. cepacia* kompleks suşlarını içermektedir (28).

Burkholderia'ların taksonomik olarak bölümlere ayrılmaları bu organizmaların genomik karakteristiğinin tespitinde diagnostik laboratuvarlar açısından problem yaratmaktadır (25, 28). *B. cepacia* kompleksi genomvar I'den genomvar VII'ye kadar olan tüm *Burkholderia*'lara *B. cepacia* kompleks adı verilmiştir (22, 27).

B. cepacia kompleksinde %30-%60 arasında DNA-DNA hibridizasyonuna sahip çeşitli türlerden örnekler bulunur, aynı türlerden elde edilen değerler genelde %70'den yüksektir. Diğer *Burkholderia* türlerinden alınan DNA-DNA bağlayıcı değerler genelde %30'un altındadır. Bu değerler 3 kategoride incelenir. Tek türler arasındaki yüksek DNA ilgisi (%70 ve üstü), tür düzeyi altındaki düşük önemsiz DNA ilgisi (%30 ve altı), *B. cepacia* kompleksinin farklı üyelerinden elde edilen 16S ribozomal DNA (rDNA) dizileri arasındaki benzerlik (>%97,7), benzeri diziler ve diğer *Burkholderia* türleri arasındaki benzerlikten daha yüksektir (19, 28, 30, 31).

1.2.2. *Burkholderia cepacia* kompleks

Topraktan, sudan ve bitkiden de izole edilebilen bir mikroorganizmadır. *B. cepacia* kompleksi diğer fırsatçı enfeksiyon etkeni olan bakterilerden daha nadir olarak kronik granulomatozis hastalığı olanlarda, kanserli hastalarda, transplantasyon hastalarında ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir (32, 33).

Gram negatif *B. cepacia* kompleksi özellikle kistik fibroz hastalarında oldukça problem yaratan bir akciğer patojeni olarak bildirilmektedir (15).

Bakteriyal kökenli akciğer patojenleri olarak sunulan *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* ve *Haemophilus influenzae*'nin yanında son zamanlarda *B. cepacia* kompleksi'nin de büyük önem taşıdığı bildirilmektedir. Aynı zamanda *B. cepacia* kompleksi hastane kökenli enfeksiyonlar yaratabildiği gibi hastane dışı sosyal temaslar yolu ile de sıklıkla bulaşabilen bir patojendir (34, 35).

Solunum yolu enfeksiyonlarında *B. cepacia* kompleksin *P. aeruginosa* ile birlikte bulunabildikleri zamanda kistik fibroz hastaları için oldukça önemli patojenler olarak yer aldıkları bildirilmiştir (36). *B. cepacia* kompleksin virulent hastalar arasında kolaylıkla yayılma özelliğine sahip olduğu ve sosyal temaslar sırasında çok hızla yayılabilen bir bakteri olduğu bildirilmiştir (37, 38).

Sekonder enfeksiyon etkeni de olan *B. cepacia* kompleksi'nin sebep olduğu akciğer enfeksiyonları, kronik granulomatozis hastalarında meydana gelince pnömoni ve sepsis ile ortak seyreden oldukça ağır şiddetli bir hastalığa neden olurlar (39, 40, 41, 42).

Beyin abseli hastaların kulak sıvılarından alınan örneklerde ikincil enfeksiyon etkeni olarak *B. cepacia* kompleksi'nin varlığı tespit edilmiştir (43).

B. cepacia kompleksi türlerinin son yıllarda akciğer enfeksiyonlarını şiddetlendirmede büyük rol oynadığı belirtilmektedir. Aynı zamanda bu bakteri tarafından infekte olmuş kistik fibroz hastalarında şiddetli ilerleyen bakteriyemi ile birlikte solunum bozukluğunun da ortaya çıktığı bildirilmektedir (44, 45).

Birbiri ile yakın ilişkili türleri veya genomovarları içeren *B. cepacia* kompleks öneminin kistik fibrozlu hastalarda gelişen pnömoniden kaynaklandığı bildirilmiştir (46). Bakterinin kolonizasyonu ve daha sonra enfeksiyon gelişmesinde hastalar için yoğun bakım ünitelerinde kullanılan solunum terapi ekipmanlarının da önemli olduğu çeşitli araştırmalar sonucunda vurgulanmıştır.

1985'de *B. cepacia* kompleks bakterileri için selektif besiyeri geliştirildikten sonra kistik fibrozlu hastalardan çok daha fazla identifiye edilebilmiştir. Bu popülasyonda *B. cepacia* kompleks prevalansının %7'lerden %40'lara çıktığı bildirilmektedir. *B. cepacia* kompleks türü ile infekte olmuş hastaların çoğunda kronik bir seyir görülür. Hastaların durumları bakterinin virulansı ile uyumlu bir şekilde kademeli olarak bozulur. Fakat enfeksiyon birden saldırgan hale dönerek, hızla gelişen ateş ve

bakteriyemi ile birlikte hasta bir yıl içinde kaybedilebilmektedir. Klinikte “Cepacia sendromu” olarak adlandırılan bu durum hastaların % 20 kadarında ortaya çıkar (33). Doğada var olduğu bilinen diğer nonfermentatif bakteriler gibi *B. cepacia* kompleks de sıvı ortamlarda üreyerek dezenfektan çözeltileri, distile su, fizyolojik tuzlu su gibi sıvıları kontamine edebilmektedir. Bu şekilde diyalizat sıvılarında da üreyerek hemodiyaliz hastalarında salgın oluşturduğu bildirilmiştir (47).

Kronik hemodiyaliz hastalarında kullanılan çeşitli solüsyonların kontaminasyonu sonucunda hastalarda dış kaynaklı enfeksiyon riskinin arttığı bildirilmiştir. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda (RAPD analizi) dilüe klorheksidin-setrimid (chlorhexidine-cetrimide) solüsyonunun transfer kataterinde *B. cepacia* kompleks izole edilmiştir. Kaitwash ve arkadaşları çalışmaları sonucunda 9 hastada dış kaynaklı enfeksiyon etkeni olan *B. cepacia* kompleks enfeksiyonunun varlığını bildirmişlerdir (48).

B. cepacia kompleks suşlarından kaynaklanan enfeksiyonların kontrol edilebilmesi bu bakterinin bir çok antibiyotiğe karşı geliştirdiği dirençten ötürü oldukça zordur. Bu sebeple bakterinin duyarlı olduğu antibiyotığın belirlenmesi ve tedavinin doğru verilmesi oldukça önem taşımaktadır (35, 37).

B. cepacia kompleks üyeleri ile gelişen enfeksiyonların tedavisi çok ciddi bir problem oluşturmaktadır. Birçok antibiyotiğe karşı doğal olarak dirençlidirler. Trimetoprim-sulfametoksazol, seftazidim, meropenem, siprofloksasin bu bakterilere karşı en etkili ajanlar olarak bildirilse de kistik fibroz hastalarından izole edilen *B. cepacia* kompleks bildirilen bu antibiyotiklere karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. Kompleks içinde bulunan bakterilerden bazıları, antibiyotiklere karşı daha duyarlı bulunmakla birlikte, özellikle genomovar III’e bağlı bulunan bazı türler, kullanımda olan antibiyotiklerin tamamına karşı direnç geliştirmişlerdir (panrezistans) (33).

İngiltere yapılan bir başka çalışmada 21 erişkin kistik fibrozlu hastadan izole edilen *B. cepacia* kompleks suşlarının (genomovar III) %86’sı denenen tüm antibiyotiklere dirençli, % 14’ü ise çoğul dirençli bulunmuştur (49).

Klinisyenler *B. cepacia* kompleks enfeksiyonlarının tedavisinde olumlu etki siprofloksasin-piperasilin kombinasyonu (%44) saptanmıştır (50).

B. cepacia kompleks enfeksiyonlarının kontrolü için özellikle kistik fibroz hastalarının diğer hastalarla aynı odaları paylaşmamaları gerektiği ve ayakta tedavi veren kliniklerle ise diğer hastalarla temaslarının kısıtlanması gerektiği belirtilmektedir. Hastanede kazanılan Gr(-) bakteriyemiler arasında 4. sırada yer aldığı bildirilen *B. cepacia* kompleks özellikle bağışıklık sistemi zayıflamış kanser vakalarında daha sık görüldüğü saptanmıştır. Bu tip hastalarda %33-38 oranında mortaliteyi arttırıcı etken olarak bildirilmiştir (35).

Dünya üzerinde yaşayan insan popülasyonunu bu kadar büyük ölçüde etkilediği bildirilen bir bakterinin kistik fibrozlu hastaların balgam kültürlerinden elde edilen örneklerinin *Xanthomonas maltophilia* olmasına rağmen *B. cepacia* kompleks (*P. cepacia*) ile klinik açıdan karıştırılmasının büyük bir problem olduğu bildirilmiştir (51). Bu sebeple başta *B. cepacia* kompleks izolasyonu sonra ise identifikasyonunun oldukça büyük önem taşıdığı bir çok çalışmada bildirilmiştir (52, 53).

B. cepacia kompleks, besiyerinde yavaş üremeye meyilli bir bakteridir ve aynı zamanda rutin balgam kültüründe çeşitli morfolojilere sahiptir. Bu sebeple besiyerlerinde çeşitli solunum yolu patojenlerine benzer morfolojilerde görüntüler verebilir (53, 54).

B. cepacia kompleks ve benzeri organizmaların identifikasyonu için kullanılan metotlar Gr(-) nonfermenterleri tam olarak identifiye edecek kapasiteye sahip olmalıdır. Ayrıca hem *B. cepacia* kompleksini Gr(-) nonfermenterden ayırt edebilmeli hem de *B. cepacia* kompleks üyelerini identifiye edebilmelidir (55).

B. cepacia kompleksi'nin izolasyonunda kullanılan biyokimyasal reaksiyon anahtarında glikoz ve ksiloz oksidasyonu pozitif, maltoz, laktoz ve sukroz oksidasyonu pozitif, lizin dekarboksilazın ise zayıf pozitif oksidasyon reaksiyonu verdiği bildirilmiştir (6).

Rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *B. cepacia* komplekse ait türlerin kesin identifikasyonunun oldukça zor olduğu yine araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Fenotipik olarak *B. multivorans* ve *B. vietnamiensis*'in daha kolay tespit edilebildiği, *B. stabilis*'in ise büyüme karakteristiği ile beraber biyokimyasal testlerle identifiye edilebildiği tespit edilmiştir. Yine de genomvar I ve III'ün ayırımında klasik testlerin yetersiz kaldığı belirlenmiştir. Bu nedenle *B. cepacia* kompleksinin identifikasyonunda rRNA bölgesinin çoğaltılmasına dayanan G1-G2 oligonükleotid primerlerinin kullanıldığı PCR testlerinin genomvarların birbirinden ayrılarak identifiye edilmesinde daha başarılı olduğu tespit edilmiştir (56).

Kistik fibrozlu İtalyan hastalarından alınan 10 balgam ve yoğun bakım hastasından alınan bir adet vajen örneğinde *B. cepacia* kompleks identifikasyonu API20 NE ile yapılmıştır. İzolatların doğrulanması ise PCR tekniği kullanılarak yapılmıştır (57).

Kistik fibroz hastalarından izole edilen *B. cepacia* kompleks örneklerinin genotipik identifikasyonunda kromozomal DNA'nın PCR'la çoğaltılması için türe özgü spesifik primerler kullanmışlardır (58).

Akciğer enfeksiyonlu kistik fibroz hastaların balgamlarından izole edilen *B. cepacia* kompleks üyelerinin identifikasyonunda PCR'ın hızlı, güvenilir, tekrarlanabilen bir teknik olduğu bildirilmiştir (59).

B. cepacia kompleks bakterilerinin kendi arasında farklı genomvarları içerdiği bildirilmektedir. İnsan enfeksiyonlarında birbirine yakın ve akraba olan türleri örneğin *B. cepacia* kompleks ve *P. aeruginosa*'yı identifiye etmekte çeşitli zorluklar yaşanmaktadır. Ancak günümüzde 16S rRNA (16S rDNA) ve recA genine dayanan moleküler tür identifikasyonları *B. cepacia* kompleks için daha hızlı ve güvenilir testler olarak önerilmektedir (30).

Kistik fibroz hastalarının balgam örneklerinden izole edilen suşların *B. cepacia* kompleks üyelerinin bilinen 9 türünden birisi olduğunu tespit etmek amacıyla türe

özgü 16S rDNA ve rec-A tabanlı PCR moleküler yöntemleri kullanılmıştır. Aynı örneklerin genotiplendirilmesinde ise rep-PCR ve RFLP teknikleri kullanılmıştır (60).

Kistik fibroz hastalarının direkt balgam örneklerinde *B. cepacia* kompleksin hızlı identifikasyonunda rec-A tabanlı PCR ve RFLP analizinin uygulanabilir olduğu tespit edilmiştir (61).

Kistik fibrozlu 255 hasta ve kistik fibrozlu olmayan 43 hastanın balgam örneklerinden izole edilen 627 *B. cepacia* kompleks izolatına PCR tabanlı moleküler test olan RAPD metodu uygulanmıştır. Araştırmalar sonucunda *B. cepacia* kompleks epidemiyoloji çalışmaları için RAPD tiplendirmesinin PCR ribotiplendirmesine göre daha duyarlı ve çok yönlü bir analiz metodu olduğu vurgulanmıştır (62).

Araştırmacılar çalışmalarında önemli derecede fırsatçı patojen ve genetik heterojeniteye sahip olan *B. cepacia* kompleksinin genetik türlerinin tiplendirilmesinde flagellin geninin analizini kullanmışlardır. 30 *B. cepacia* kompleks suşuna flagellin geninin (fliC) analizi için PCR ve RFLP moleküler tekniklerini uygulamışlardır. Çalışmaları sonucunda *B. cepacia* kompleks suşları arasındaki genetik çeşitliliğin tespitinde flagellin genotiplendirmesinin uygun bir metot olduğunu bildirmişlerdir (63).

Kistik fibroz hastalarının balgam örneklerinden elde edilen *B. cepacia* kompleks suşlarının identifikasyonunda, taksonomi çalışmalarında PCR ve PFGE ve RAPD metotlarının kullanılabileceği bildirilmiştir (64).

Araştırmacılar kistik fibroz hastalarında oldukça problem yaratan *B. cepacia* kompleks suşlarının epidemiyoloji çalışması için oldukça fazla çeşitteki örnekleri hastaların balgamından, ve Uluslararası Bakteri Kültür Koleksiyonundan temin etmişler ve toprak, soğan, kan kültürü, idrar, trakeal aspirat ve balgam örneklerinden izole edilmiş olan *B. cepacia* kompleks suşlarını da alınmıştır. Bu suşlar fd1 ve rd1 primer çifti kullanılarak yapılan 16S rDNA analizi çalışmasına ilave olarak *Alu I*, *Cfo I*, *Dde I*, *Msp I* ve *Nci I* (Gibco-BRL) restriksiyon endonükleaz enzimleri ile RFLP

çalışması yapılmıştır. Araştırmalar sonucunda bu tekniklerin *B. cepacia* kompleks genomvarlarının belirlenmesinde uygulanabilir ve tekrarlanabilir testler oldukları bildirilmiştir (65).

Araştırmacılar çalışmalarında çocuk ve yetişkin kliniğine gelen 450 kistik fibroz hastasının 62'sinin balgam kültürlerinden izole ettikleri 281 *B. cepacia* kompleks izolatının mikrobiyolojik ve moleküler epidemiyolojisini belirlemek amacıyla RAPD analizini kullanmışlardır. RAPD analizi sonucunda çıkan genetik tipleri *Spe I* restriksiyon endonükleaz enzimi ile RFLP uygulamasına tabii tutmuşlardır (66).

NASA tarafından suda yaşayan patojenlerin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, türe özgü olarak kullanılan oligonükleotid primerler sayesinde patojen bakteri örneklerinin identifikasyonun yapıldığı ve suda yaşayan patojenin *Escherichia coli* mi, *P. aeruginosa* mı yoksa *B. cepacia* kompleks mi olduğunun ayırt edilebileceği bildirilmiştir (67, 68).

P. aeruginosa'dan *B. cepacia* kompleks tanımına geçişte yararlanılan moleküler yöntemler bilinen diğer *Burkholderia* türlerinin identifikasyonu içinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu sayede diğer *Burkholderia* türlerinin de identifikasyonu ve genotiplendirilmesi yapılabilmektedir. *B. mallei* ve *B. pseudomallei* gibi laboratuvar personeli için patojenite açısından oldukça büyük bir risk oluşturan bu bakterilerin identifikasyonunda hızlı, çalışanlar açısından enfeksiyon oluşturma riski daha az olan ve her iki türü birbirinden kolaylıkla ayırmaya yardımcı olan PCR kullanılmıştır (69).

B. pseudomallei izolatları arasındaki genetik farklılığı tespit etmek için PCR tabanlı tiplendirme metotları kullanmıştır. Çalışmada bakterinin DNA'sını çoğaltmak için iki adet oligonükleotid primer çifti ile multipleks-PCR yapılmıştır. *B. pseudomallei*'nin epidemiyolojik tiplendirmesinde *Hind III* ve *pKK4-S23L* restriksiyon endonükleaz enzimlerini kullanılarak RFLP gerçekleştirilmiştir (70).

Yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda moleküler tekniklerin klasik identifikasyon ve tiplendirme tekniklerine oranla daha seçici, daha güvenilir ve istenildiği anda tekrarlanan, kısa zaman içerisinde sonuç veren yöntemler olduğu tespit edilmiştir (29, 56).

Çalışmada *B. cepacia* kompleks izolatlarının identifikasyonu ve tiplendirmesi için moleküler teknikler kullanılmıştır. Laboratuvar imkanlarımıza uygun olarak seçilen PCR, AP-PCR, restriksiyon endonükleaz enzimi ile doğrulama, DNA dizi analizi ve DNA biyoanalizi ile izolatlar çalışılmıştır.

1.3. Kullanılan Moleküler Teknikler Hakkında Genel Bilgiler

1.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

İlk kez 1985’de ABD’de Cetus Corporatiun’da çalışan Henry A. Erlich, Kery Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilerek bilim dünyasına sunulan PCR, izole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA) spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımı ile enzimatik olarak sayıca çoğaltılmasıdır. Kısaca hücre içinde gerçekleşen doğal DNA replikasyonunun laboratuvar koşullarında tüp içersinde taklit edilmesi esasına dayanan bu yöntem invitro olarak klonlamadır. Bu şekilde nükleik asitlerin analiz edilmeleri mümkün olmaktadır (74, 75).

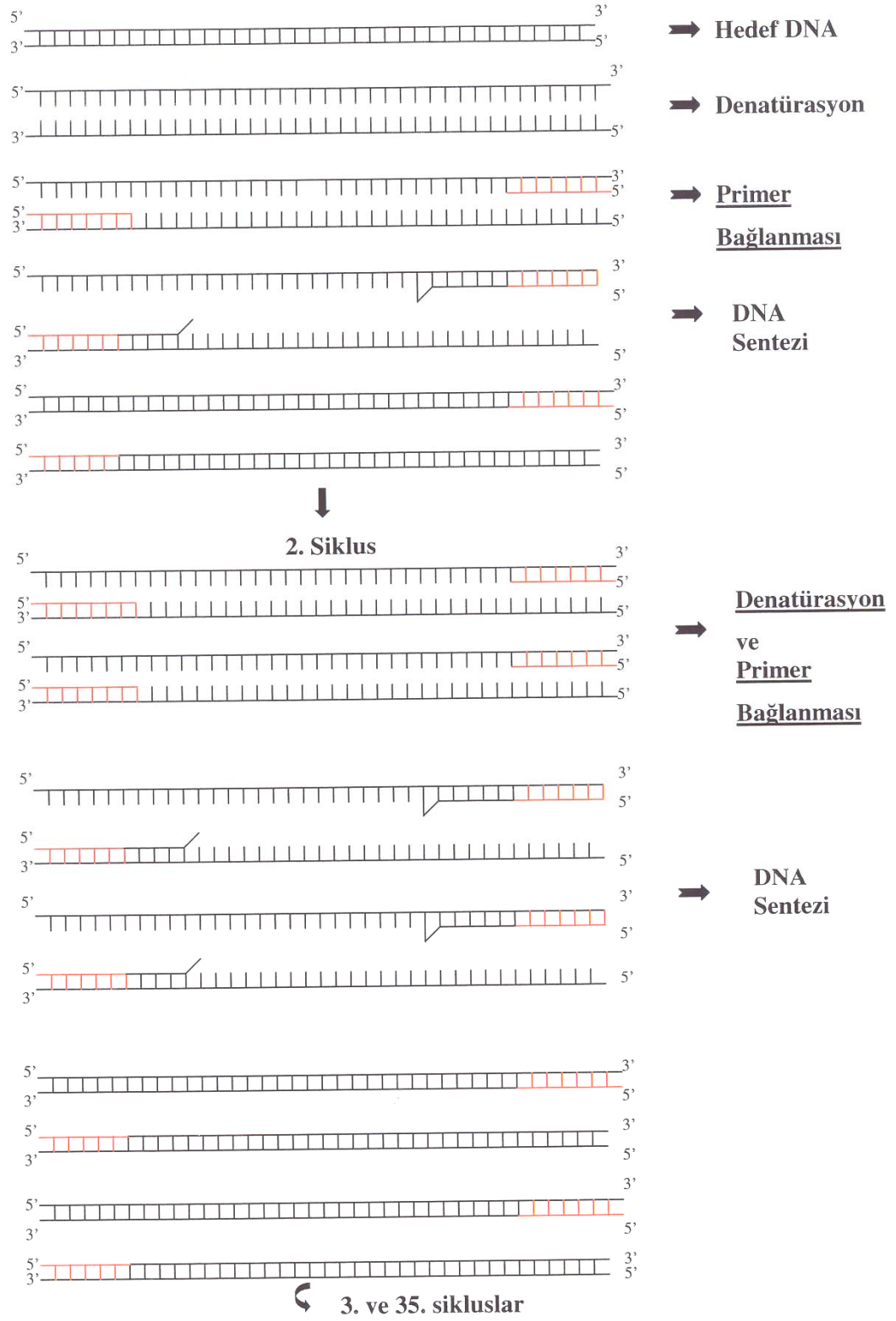
PCR’ da DNA Replikasyonu 3 Aşamada Gerçekleşir.

- 1- Denatürasyon: İki DNA zincirinin yüksek sıcaklıkta (94°C-98°C) birbirinden ayrılmasıdır. DNA replikasyonunun başlayabilmesi için DNA zinciri arasındaki hidrojen bağlarının kırılarak zincirlerin birbirinden ayrılması gerekir. Yaşamını 37°C’de sürdüren hücrede denatürasyon adı verilen zincir ayrılması, bir kısmı enzim yapısında olan yardımcı proteinlerle gerçekleştirilir. PCR’da ise zincir ayrılması DNA moleküllerinin yüksek sıcaklığa dayanıklı olması nedeniyle ortamın 94°C-98°C’ye kadar ısıtılmasıyla mümkün olmaktadır (72).

- 2- Hibridizasyon: (Primer bağlanması) Sentetik oligonükleotitlerin hedef DNA'ya bağlanmasıdır. Hücre içersinde replikasyonun başlayacağı bölgede primaz adı verilen bir enzim tarafından genellikle 12 nükleotit uzunluğunda bir RNA primeri yapılır. DNA polimeraz DNA sentezi yapmak üzere bu primere bağlanır. PCR işleminde ise replikasyonun başlatılacağı bölgenin iki ucuna özgü bu bölgedeki baz dizilerini tanımlayıcı sentetik oligonükleotit primerler tepkime karışımının içine önceden konur. Reaksiyon 37°C-65°C'de gerçekleşir (72).
- 3- Polimerizasyon: (çift iplikçikli DNA sentezi) Spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler DNA'ya eklenerek baz sıralarının sayısal olarak artması yani zincirin uzaması sağlanır. Bu reaksiyon 72°C'de gerçekleşir (72). Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik görünümü şekil1.1'de gösterilmiştir.

1.3.2. PCR' ın kullanım alanları

- 1- Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı. (AIDS, Lyme hastalığı, Klamidya, Tüberküloz ve diğer kalıtsal hastalıkların tanısı)
- 2- Prenatal tanı.
- 3- Klinik örneklerde patojen organizmaların saptanması.
- 4- Adli tıpta.
- 5- Onkogenezezin araştırılmasında.
- 6- Prob oluşturma, klonlama, gen ekspresyonu.
- 7- DNA dizi analizi, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında.
- 8- Bilinmeyen dizilerin tayininde.
- 9- Geçmiş dönemlere ait DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlatılması.
- 10- RFLP analizinde.
- 11- İn vitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonrası implantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanması.
- 12- DNA protein interaksiyonunun araştırılmasında kullanılabilir (74, 75)



Şekil 1.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) şematik görünümü

PCR'ın geliştirilmesi, moleküler teknolojinin kullanım alanlarının genişlemesine yol açmıştır. PCR son yıllarda biyomedikal araştırmaların yanı sıra enfeksiyöz ajanların teşhisinde, epidemiyoloji ve genetik defektlerin saptanması ile adli tıp ve diğer alanlarda da geniş bir uygulama ortamı bulmuştur (74, 75).

1.4. Moleküler Tiplendirme

Moleküler teknikler, yalnızca kalıtsal hastalıklarda değil, özellikle enfeksiyon hastalıklarının tanısında, hastalık ajanlarının belirlenmesinde ve tiplendirmesinde, tedavinin takibinde başta olmak üzere, çok farklı alanlarda geniş çalışma ve araştırma alanları bulmuştur.

1.4.1.Moleküler tekniklerin enfeksiyon hastalıklarında kullanım alanları

- 1- Enfeksiyon ajanlarını hızlı tanısında
- 2- Enfeksiyon ajanlarının yeni tiplerinin belirlenmesinde; mutant tiplerle klinik seyir arasında ilişki kurulmasında
- 3- Yeni enfeksiyon ajanlarının bulunmasında
- 4- Etkeni belirlenmemiş hastalıklarla, enfeksiyon ajanları arasında ilişki kurulmasında
- 5- Geçmişe yönelik yada günümüzde epidemiyolojik çalışmalarda
- 6- Mikroorganizmaların direnç genlerinin belirlenmesinde
- 7- Mikroorganizmaların dokuda yerleşimlerinin belirlenmesinde
- 8- Bulaş kaynaklarındaki bakteriyel patojenlerin belirlenmesinde
- 9- Hastalık geçiş yollarının incelenmesinde
- 10- Bakteri akrabalığının araştırılmasında
- 11- Enfeksiyon ajanları ile karsinogenesis arasındaki ilişkinin aydınlatılmasında
- 12- Viral replikasyonu durduracak şekilde tedavi yaklaşımında
- 13- Antiviral tedavinin takibinde (76).

Moleküler tiplendirme teknikleri arasında en önemli olanları, genotipik yöntemlerin kullanıldığı ve mikroorganizmaların genomlarını esas alan DNA bazlı nükleik asit

analizleridir. Bunlar, daha stabil genetik karakterlere dayandığı için güvenilir sonuçlar vermektedir (77).

Moleküler genotipik tiplendirme metodları arasında

- 1- Plazmit DNA dizi analizi.
- 2- Genomik DNA restriksiyon analizi.
- 3- Prob hibridizasyon teknikleri.
- 4- PAGE (Poliakrilamid jel elektroforezi).
- 5- Gen dizi analizi.
- 6- PCR'a dayalı tiplendirme.
- 7- Ribotiplendirme, bulunmaktadır (77).

Modern klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizmaların genotiplendirilmesi ile enzim seviyelerinde allelliğin tespiti veya nükleik asit seviyesindeki polimorfizmin tespit edilmesi amaçlanmaktadır (78).

Klasik yöntemlerle yapılan parmak izi alınması (fingerprinting) yani serotiplendirme, bakteriyofaj tiplendirmesi genellikle yorucu, karışık, uzun zaman alıcı, yorumlaması zor ve şüpheli sonuçlar vermektedir (78, 79, 80, 81).

Genotiplendirme ise mikroorganizmaların kolayca ayırt edilebilmesi, kopyalanması ve tiplendirme yapılması açısından üstünlükler taşımaktadır (78, 79, 82).

Enfeksiyonların kontrolünde yeni tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır, çünkü epidemiyolojik çalışmalar için fenotipik metotlar, serotiplendirme, antibiyotik duyarlılığı yeterli değildir. Moleküler tiplendirme metotları ise bir çok suşun bir arada çalışılması ve doğru sonuçlara ulaşma açısından daha güvenilirdir (83, 84).

1.4.2. Rastgele seçilen primerle yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (Arbitrarily primed polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR)) hakkında genel bilgi

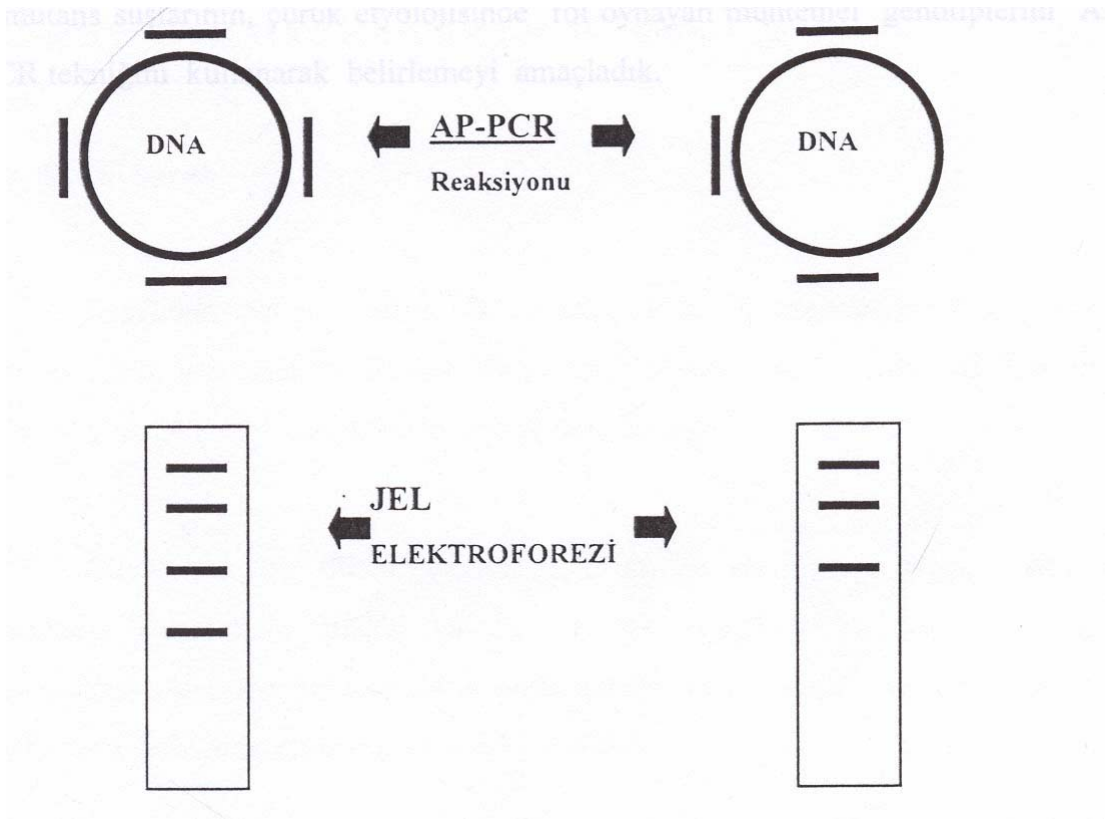
AP-PCR kullanılması oldukça kolay bir tekniktir. AP-PCR’da 10 ila 20 arasında rastgele seçilen baz dizilerini taşıyan primerler kullanılır. AP-PCR reaksiyonunun PCR döngüsü kullanılacak olan primerin uzunluğuna göre elde edilecek bant sayısına göre değişiklik gösterir. PCR döngüsü ayarlanır. protozoa, fungus ve bakterileri içeren mikrobial patojenlerin genetik popülasyon analizinin oranlanması ve suşların genotipik olarak biçimlendirilmesinde hızlı, basit ve güvenilir bir teknik olarak uygulanmaktadır. AP-PCR ile genom sekansına ait herhangi bir bilginin olmadığı izolatlarında tiplendirilmesi mümkündür. AP-PCR ile yapılan gruplandırmanın gücü keyfi olarak seçilen primere ve PCR işleminin şartlarına göre çeşitlilik kazanır. AP-PCR metodu tiplendirmede hızlı bir teknik olup tür içi çeşitliliğin karşılaştırmasının kolay bir şekilde yapılmasını sağlar (85).

Çalışmada kullanmayı seçtiğimiz bu metod, rastgele seçilen bir primerle yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) olarak bilinmektedir (86).

AP-PCR aynı türdeki bakterilerin parmak izlerinin (fingerprinting) belirlenerek, bakteriyel enfeksiyonların geldikleri kaynağın bulunmasında kullanılır. Aynı zamanda tür içindeki genotipik farklılıkları belirlemede de kullanılır. AP-PCR’de tek bir primer kullanılır. Bakteri DNA’sında spesifik olan bölgeler çoğaltılır. Daha sonra çoğaltılan DNA segmentleri jel elektroforezinde çözümlenerek bantlardan elde edilen modeller değerlendirilerek türler karşılaştırılır (Şekil 1.2).

AP-PCR metodu kistik fibroz hastalarından izole edilen *P. aeruginosa*’nın tiplendirilmesinde kullanılmıştır (86).

Rastgele seçilen primerle yapılan AP-PCR’ da çoğaltmanın fiziksel durumu (sıcaklığı vb.) veya reaksiyonu oluşturan maddelerin konsantrasyonları PCR sonucunu etkilediği belirtilmektedir. Bu nedenle PCR komponentleri standardize edilmelidir (87, 88, 89).



Şekil 1.2. AP-PCR işlemi ve tek bir kısa primer ile çoğaltılan DNA'nın elektroforez görüntüsü şematize edilmiştir.

1.5. DNA Dizi Analizi

Bu yöntem, elde edilen PCR ürünlerinin pürifiye edildikten sonra, floresan ile işaretli nükleotidlerle sonlandırılarak nükleotid dizisinin cihaz tarafından belirlenmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Sonlandırma, reaksiyon karışımına ilave edilen farklı floresan boyalarla işaretlenmiş ddNTP' ler tarafından sağlanır. Bu ddNTP' lerin 3' ucunda serbest hidroksil grubu bulunmaz. Bu sebeple uzamakta olan PCR ürününe ddNTP bağlandıktan sonra yeni bir baz bağlanamamaktadır. Böylece, pürifiye PCR ürünlerinin şablon olarak kullanıldığı bir PCR reaksiyonu olan 'cycle sequencing' esnasında, farklı işaretli nükleotidlerde sonlanmış değişik uzunluklarda PCR ürünlerinin elde edilmesi sağlanır. Elde edilen bu dizilerin cihaz tarafından okunması sonucunda PCR ürününü oluşturan her bir nükleotid sırasıyla belirlenebilir (61).

1.6. DNA Analizi (Biyoanaliz)

PCR yöntemi ile çoğaltılan bakteri DNA'larının analizine dayanan bir tekniktir. Bu tekniğin kullanımı esnasında Multipleks – PCR, Real-Time (RT)-PCR veya AP-PCR ile çoğaltılan DNA ya da RNA'ların parmak izleri zayıf bantlardan çok güçlü bantlara kadar alınır. Bantların değerlendirilmesi bilgisayar ortamında yapılır. Her derecedeki bant büyüklüğü sayısal olarak belirlenir. PCR'la elde edilen çoğaltma ürünleri Lab-on-a-chip ve Caliper Teknolojisinin bir arada kullanılmasıyla enzimatik reaksiyonların dış kaynaklı olduğunun belirlenmesi ve sekans reaksiyonu veya klonlama denemelerinden önce ürünlerin sayısal kalıbının çıkarılması amacıyla yapılır; aynı zamanda tür içi çeşitliliği de ortaya çıkarmada oldukça başarılı bir tekniktir. Bu sistem Lab-on-a-chip: Agilent 2100 biyoanalizör cihazı biyolojik görüntüleme programı, bilgisayar, yazıcı ve örneklerin konulduğu kitin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Lab-on-a-chip ve Caliper teknolojisi birlikte kullanıldığında istenilen sonuçlar alınır. Nükleik asitlerin ayrılması ve tespit edilmesi için örnek kapiller sisteme konulur. Bu şekilde uzun basamaklı laboratuvar işlemleri kısaltılmış olmaktadır. Hızlı ve kolay uygulanan bir teknik olarak kullanılmaktadır (90). Örneklerin her birinin DNA büyüklüğünü kolay ve hızlı olarak veren bir tekniktir. Tekniği uygularken yapılması gereken sadece DNA örneklerinin çalışma kitine yerleştirilmesi ve bilgilerin dijital olarak değerlendirilmesidir. Kullanılan DNA LabChip kitleri çoğaltma ürününün DNA parçalarının büyüklüğünün sayısal niteliğini verir elde edilen sonuçları ise bilgisayar ortamında jel görüntüsü, grafik değerleri ve sayısal sonuçlar olarak alınabilir ve sonuçlar dosya halinde bilgisayarda saklanabilir. Bu teknik, agaroz jelde ve poliakrilamid jelde görünmeyen tüm zayıf bantların ve aynı zamanda birbirine çok yakın olup ayırt edemediğimiz bantların tespit edilebilmesi ve ölçülebilmesinden dolayı yüksek duyarlılığa sahiptir. Aynı zamanda sonuçların uzun süre saklanabilmesi istenildiği anda ulaşılabilmesi açısından da oldukça kullanışlı bir sistemdir. Oysaki agaroz jel ve poliakrilamid jel uzun süre saklanamaz; çünkü bu jel tiplerinde kuruma, kırılma ve ethidium bromidin uçmasından dolayı bant görüntüsünün kaybolması söz konusudur.

1.6.1. DNA biyoanalizinin avantajları

- 1- Yüksek Duyarlılık: 0,5ng'dan küçük olan DNA parçalarının lazer (LIF) kullanılarak tespit edilmektedir.
- 2- Az Miktarda Örnekle Sonuç Alabilmek: Yalnızca 1µ DNA örneği ile analiz yapabilme imkanı sağlar.
- 3- Hızlı Sonuç: Bir defada 12 örneğin 30 dakika içerisinde analizi otomatik olarak yapılır.
- 4- Çabuk ve Kolay Örneklerin Karşılaştırılması: DNA analiz sonuçları bilgisayar ortamında saklandığı için elde edilen sonuçların karşılaştırılmasına olanak sağlar.
- 5- Zayıf Bantları Tespit Edebilme: Güçlü bantlardan sonra gelen zayıf bantların ölçümüne olanak sağlar.
- 6- Sonuçların Saklanması: Dijital verilerin sunum ve yayım için saklanabilmesi.
- 7- Verilerin Çeşitli Şekillerde Gösterilebilmesi: Elde edilen verilerin istenildiği şekilde görüntülenebilir. Örneğin grafik, sayısal veri veya jel görüntüsü olarak alabilme imkanı sağlar.
- 8- Biyolojik Hasarlarda Düşme: Ethidyum bromid veya diğer kanserojen etkili materyallerin son derece az kullanılması önemlidir (91).

2. MATERYAL METOT

Araştırmada 10.03.2003-20.05.2004 tarihleri arasında 89 hastadan izole edilen 93 *Pseudomonas spp.* suşu çalışılmıştır. Bu suşlar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarından temin edilmiştir. Hastalardan alınan örneklerin kültürü MacConkey agara yapılmıştır. MacConkey agarda laktoz negatif kolonilerin gelişimi gözlenmiştir. Üreme ortamında mavi-yeşil pigment oluşturan koloniler seçilerek biyokimyasal testlere alınmıştır. *Pseudomonas* tanısının konulmasını sağlayan tipik özelliklerden faydalanılmakla birlikte oksidaz, katalaz, oksidasyon-fermentasyon besiyerinde asit ve gaz oluşturma özelliği, glukoz, ksiloz, mannitol, laktoz, 42°C'de üreme, üre, indol, eskülin, üç şekerli demirli yatık agar (TSI) testleri yapılmıştır. Bu testler sonucunda *Pseudomonas* tanısı konulan suşlar çalışmaya alınmıştır. Elde edilen suşların 27 kan izolatu 'invaziv grup' içerisinde değerlendirilirken, 17 yara, 19 aspirat, 12 idrar, 13 balgam, 1 göz, 2 vagen ve 2 boğaz kültüründen elde edilen isolatlar 'noninvaziv grup' olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışmada API20 NE (BioMeriux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile test edilen 4 ayrı hastaya ait 4 *B. cepacia* kompleks izolatu çalışmada kullanılmıştır. Bu isolatların kültürlerine göre dağılımı 2 kan, 1 yara ve 1 göz örneğidir. Daha sonra İzolasyon ve identifikasyonu yapılan 4 *B. cepacia* kompleks ile 93 *Pseudomonas spp.*'in DNA izolasyonu fenol-kloroform tekniği ile yapılmıştır (58, 92). DNA izolasyonu gerçekleştirilen suşlar için PC480-PC1250 sentetik oligonükleotid primerleri kullanılmıştır. Bu primer aracılığı ile *B. cepacia* kompleks için spesifik olan 770bp'lik 16S rRNA (DNA) gen bölgesi çoğaltılmıştır (93). PCR işlemi sonucunda elde edilen örneklerin 16S rRNA genine ait sekans dizisine uygun olan *Tsp 509I*, *Rsa I*, ve *Taq I* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile doğrulanmıştır. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile doğrulanan *B. cepacia* kompleks suşlarının nükleotid dizisinin belirlenmesi için seçilen örneklerin PCR ürünleri temizlendikten sonra (94), pürifiye PCR ürünlerine DNA dizi analizi yapılmıştır (61). Bu testlerin sonucunda *B. cepacia* kompleks olduğu belirlenen örneklerin moleküler bant yapılarını tespit için örneklere AP-PCR uygulanmıştır (62, 95). AP-PCR ürünlerinin değerlendirmesi poliakrilamid jel kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada son olarak AP-PCR ile elde edilen bant büyüklüklerinin sayısal olarak tam ve doğru belirlenebilmesi PAGE'de gözle net

olarak göremediğimiz çok büyük ve çok küçük bantların tespitini sağlamak için AP-PCR ürünlerinin DNA biyoanalizi yapılmıştır (90).

2.1. *Pseudomonas spp.* ve *B. cepacia* kompleks bakterilerinden DNA izolasyonu (Fenol-Kloroform Tekniği)

I.gün

- 1- Bir petrinin yüzeyinde üreyen 300 koloni civarındaki bakterilerin ¼'ü alınarak 1000 µl Tris-EDTA (TE) içerisine süspanse edilir.
- 2- 3000×g' de 10 dakika santrifüjlenir (ThermoIEC, A.B.D.) ve üst sıvı dökülür.
- 3- Üzerine tekrar 1000 µl TE eklenir, vortekslenir.
- 4-1,5 cc'lik ependorf içerisinde kalan örneğin üzerine 200 µl TE ve 200µg/ml proteinaz K (Fermentas, Litvanya) eklenir ve vortekslenir. 55°C' lik su banyosunda 24 saat bekletilir.

II.gün

- 1- Karışıma 1000 µl TE ilave edilir vortekslenip bu karışımdan 400 µl alınarak yeni bir 1,5 cc'lik ependorfa alınır, üzerine 400 µl fenol eklenip vortekslenir. 11000×g'de 5 dakika santrifüjlenir.
- 2- Üst faz yeni bir 1,5 cc'lik ependorfa aktarılır, üzerine 400 µl kloroform eklenip vortekslenir ve 11 000×g' de santrifüj edilir.
- 3- Üst faz yeni bir 1,5 cc'lik ependorfa aktarılır toplam hacmin 1/10'u kadar 3 M Sodyum asetat (pH= 5,2) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik etil alkol (Tekel, Türkiye) eklenip karıştırılır. -20°C'de 30 dakika soğutulur. 14 000×g'de 10 dakika santrifüjlenir. DNA çöktürülerek üst kısım atılır.
- 4- DNA üzerine 1000µl soğuk %70'lik etil alkol (Tekel, Türkiye) eklenir ve 14 000×g'de 10 dakika santrifüjlenir, alkol ortamdan pipet yardımı ile alınır.
- 5- DNA oda ısısında kurutulup üzerine 50 µl TE eklenir. Elde edilen ürün, %1 (wt/vol)'lik agaroz jel (Prona Basica LE Agorose, AB) elektroforezine (Owl USB,

A.B.D.) tabi tutulduktan sonra, ethidyum bromid (Sigma, A.B.D.) ile boyanır
302nm’de ultraviyole ışık altında görüntülenir. (58, 92)

2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

2.2.1. TE (Tris-EDTA)

1M TrisHCl (Sigma, A.B.D.) pH=8 1ml
0,5 M EDTA (Sigma, A.B.D.) pH=8 0,2ml
distile su ile 100ml’ye tamamlanır.

2.2.2. Tris-HCl

Tris base (Amresco, A.B.D.) 121,1gr
HCl 42 ml
pH=8 ayarlaması mutlaka oda sıcaklığında yapılır.
distile su ile 1000 ml’ye tamamlanır.

2.2.3. Sodyum Asetat

Sodyum asetat (Sigma, A.B.D.) 408,1gr
pH=7’ye asetik asit ile ayarlanır.
distile su ile 1000 ml’ye tamamlanır.

2.2.4. EDTA

disodyum ethilenediaminetetraacetat (AppliChem, Almanya) 186,1gr
renk berraklaşana kadar NaOH (Carlo Erba, İtalya) pelletleri ilave edilir.
pH=8’e ayarlanır.
distile su ile 1000 ml’ye tamamlanır.

2.2.5. 5×Trisma base (TBE)

Trisma-base (Sigma, A.B.D.) 54 gr
 Boric asit (Merck, Almanya) 27,5 gr
 0,5M EDTA (Sigma, A.B.D.) 20 ml
 distile su ile 1000ml'ye tamamlanır.

2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR işlemi ile *B. cepacia* kompleks için spesifik olan 770 baz çiftlik (bç) 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması hedeflenmiştir. Bu bölge için spesifik olan PC480 5'-GGT ACC GGA AGA ATA AGC-3' (BioTez, Almanya) ve PC1250 (BioTez, Almanya) 5'-CTG TTC CGA CCA TTG TAT-3' sentetik oligonükleotid primerleri kullanılmıştır. Sentetik oligonükleotid primerlerin liyofilize stoklarının konsantrasyonları 265 pmol/μl PC480 ve 529,5 pmol/μl PC1250 olarak üretici firmadan sağlanmıştır. PCR işlemi için bu primerlerin son konsantrasyonları 1000 pmol/μl olacak şekilde sulandırılmıştır. PCR işlemi sırasında her bir örnek için primerlerin konsantrasyonları 10 pmol/μl olarak kullanılmıştır (93).

2.3.1. PCR karışımı

PCR karışımı literatürde belirtildiği şekilde (89), toplam hacim 100 μl olarak 0,5ml'lik eppendorta hazırlanmıştır.

10× Tampon (NH ₄) ₂ SO ₄)	(Fermentas, Litvanya)	10 μl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	(Fermentas, Litvanya)	200 μM (her birinden)
Primer PC480	(Biotez, Almanya)	70 pmol
Primer PC1250	(Biotez, Almanya)	70 pmol
Taq DNA polimeraz	(Promega, ABD.)	1 U
MgCl ₂	(Fermentas, Litvanya)	1,5 mM

Karışıma hacmi tamamlamak için deiyonize su ilave edilmiştir.

2.3.2. DNA ilavesi

PCR karışımı hazırlanıp eppendorf tüplerine dağıtıldıktan sonra DNA izolasyonu yapılan örneklerden tüplerin içerisine DNA (yaklaşık 1 mikrolitrede 50 ng) ilavesi yapılmıştır.

2.3.3. PCR programı

PCR çoğaltması, otomatik PCR cihazında (Thermolyne Dubuque IA, ABD.) şu şartlar altında gerçekleşmiştir: 94°C’ de 5 dakikalık ilk denatürasyonu takiben, 35 döngü olacak şekilde 94°C’de 1 dakika denatürasyon, 50°C’de 1 dakika yapışma, 72°C’de 2 dakika uzama ve 72°C’de 7 dakika son uzamayı takiben değerlendirmeye kadar PCR ürünleri +4⁰C’de tutulmuştur.

2.3.4. PCR ürünlerinin görüntülenmesi

PCR reaksiyonu sonucunda oluşan ürünler %1 (wt/vol)’lük agaroz jel (Prona Basica LE Agarose, AB) elektroforezine (Owl USB, A.B.D.) tabi tutulduktan sonra ethidiyum bromid (Sigma, A.B.D.) ile boyanarak 302 nm’de ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

2.4. Örneklerin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Doğrulanması

Burkholderia spp. 16S rRNA genine ait sekans dizisi temin edilerek çalışılmıştır (Gen-Bank ulaşım no: AY207313). Bu dizi üzerinde 770bç’lik gen bölgesine uygun olan çeşitli restriksiyon endonükleazların kesim noktaları belirlenmiştir (DNAsis, Hitachi-Japonya). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışmamız için *Tsp 509I* (▼AATT) restriksiyon endonükleazı (Biolab, New England), *Taq I* (T▼CGA) restriksiyon endonükleazı (Promega, A.B.D.) ve *Rsa I* (GT▼AC) restriksiyon endonükleazları (Promega, A.B.D) seçilmiş ve kesim noktaları şekil 2.1.’de gösterildiği gibi belirlenmiştir. PCR ürünleri bu üç farklı enzimle ayrı ayrı inkübe edilmiştir (65).

2.4.1. *Tsp 509I* restriksiyon endonükleaz enzimi ile inkübasyon

PCR ürünü 15µl
Tsp 509I enzimi 10U
 tampon (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA)
 65⁰C’de 1 gece su banyosunda inkübe edilmiştir.

2.4.2. *TaqI* restriksiyon endonükleaz ile inkübasyon

PCR ürünü 15µl
TaqI enzimi 10 U
 tampon (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA)
 65⁰C’de 1 gece su banyosunda inkübe edilmiştir.

2.4.3. *Rsa I* restriksiyon endonükleaz enzimi ile inkübasyon

PCR ürünü 20µl
Rsa I enzimi 10 U
 tampon (33mM Tris-asetat, 10mM Magnezyum-asetat, 66mM potasyum-asetat, 0,1 mg/ml BSA)
 37⁰C’de 1 gece su banyosunda inkübe edilmiştir.

2.4.4. Elde edilen ürünlerin görüntülenmesi

Üç farklı restriksiyon endonükleaz kullanılarak yapılan enzimle kesim işlemi sonucunda elde edilen ürünler %3 (wt/vol)’lik agaroz jel (Prona Basica LE Agorose, A.B.D.) elektroforezine (Owl USB, A.B.D.) tabi tutulduktan sonra, ethidyum bromid (Sigma, A.B.D.) ile boyanarak 302nm’de U.V. altında görüntülenmiştir.



Şekil 2.1. *B. cepacia* kompleks 770 bp'lik genin *TaqI*, *RsaI* ve *Tsp509I* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim yerleri

2.5. Rastgele Seçilen Primer ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (AP-PCR)

PCR ve restriksiyon endonükleazla doğrulanan ve *Burkholderia cepacia* kompleks olarak belirlenen örnekler genotiplendirme işlemi için AP-PCR'ye tabi tutulmuştur (62, 94). Bu işlem için önceden elde edilip stoklanan bakteri DNA'ları kullanılmıştır.

2.5.1. AP-PCR karışımı

AP-PCR reaksiyonu için AP1 5'-GTT GCG ATC-3' primeri kullanılmıştır. Bu reaksiyon için, her biri 100 µl reaksiyon karışımı içerecek şekilde hesaplanıp 0,5 ml'lik ependorf tüplere hazırlanmıştır.

10× Tampon (NH ₄) ₂ SO ₄)	(Promega, A.B.D.)	10µl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	(Fermentas, Litvanya)	2mM
Primer Ap1	(BioTez, Almanya)	50pmol
MgCl ₂	(Fermentas, Litvanya)	25mM
Taq DNA polimeraz	(Promega, A.B.D.)	1 U

Karışıma hacmi tamamlamak için deiyonize su ilave edilmiştir.

2.5.2. AP-PCR programı

AP-PCR reaksiyonu, otomatik PCR cihazında (Techne, ABD.) şu şartlar altında gerçekleştirilmiştir: 94°C'de 5 dakikalık denatürasyonu takiben, 40 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 42°C'de 2 dakika yapışma, 72°C'de 2 dakika uzama ve 72°C'de 6 dakika son uzamayı takiben değerlendirmeye kadar PCR ürünleri +4⁰C'de tutulmuştur. Elde edilen PCR ürünler %12'lik Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (PAGE) (20cm×20cm) (Owl Scientific, A.B.D.) 120 volt, 80mA ve 10 watt'ta 4 saat yürütülmüştür. PAG daha sonra gümüş boyama tekniği ile boyanmıştır.

2.6. Poliakrilamid Jelin (PAG) Hazırlanması

2.6.1. Stok çözeltileri

%30'luk akrilamid solüsyonu

Akrilamid	(Sigma, ABD)	58,8 gr
N-N'-methilen-bis-akrilamid	(Sigma, ABD)	1,6 gr

deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.

%10 AP (Amonyum persülfat)

Amonyum persülfat (Sigma, ABD) 1gr

deiyonize su ile 10 ml'ye tamamlanır, +4°C'de saklanmıştır.

%12'lik PAGE

%30'luk akrilamid 40 ml

TBE5× 20 ml

deiyonize su ile tamamlanmıştır.

%10 AP

N,N,N'N'-tetramethylethylenediamine TEMED (Sigma, A.B.D.) 35 µl

Önceden hazırlanan 0,4 mm aralığa sahip camların arasına dikkatlice dökülmüş ve sertleşmesi beklenmiştir.

2.7. Gümüş Nitrat Boyama İşlemi

2.7.1. %1'lik AgNO₃

Gümüş nitrat _{katı} (LabKim, Türkiye) 5 gr

distile su ile 500ml'ye tamamlanmıştır.

2.7.2. %15'lik NaOH

Sodyum hidroksit _{katı} (Carlo Erba, İtalya) 150 gr

distile su ile 1000ml'ye tamamlanmıştır.

2.7.3. %7,5'luk Na₂CO₃

Disodyumkarbonat _{katı} (Riedel-de Haën, Almanya) 75 gr

distile su ile 1000ml'ye tamamlanmıştır.

Örneklerin PAG elektroforezi yapıldıktan sonra cam taşıyıcıdan çıkarılan jel genişçe bir küvet içine konulmuş ve sırasıyla aşağıdaki solüsyonlarla boyanmıştır.

- 1- AgNO₃ 60 ml
 dH₂O 540 ml
 15 dakika 60rpm'de çalkalandı (Heidolph, Almanya)
- 2- NaOH 60 ml
 dH₂O 540 ml
- 3- Formaldehit 2,4 ml ile bantlar belirginleşene kadar çalkalanmıştır.
 Na₂CO₃ 60 ml
 dH₂O 540 ml stop solüsyonu ile 2-3 dakika çalkalanmıştır.

2.8. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi

B. cepacia kompleks suşlarından PC480-PC1250 primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin temizlenmesi için Wizard PCR pürifikasyon kiti (Omega, ABD) kullanılmıştır (94). Elde edilen PCR ürünü yeni bir eppendorf tüpe alınmış ve üzerine kit ile birlikte verilen PCR pürifikasyon tamponundan 100 µl ve rezinden 1 ml eklenerek karıştırılmıştır. Kit beraberindeki kolonlar, pistonu çıkartılmış 2 ml'lik enjektöre takıldıktan sonra 9 ml'lik tüplere yerleştirilmiştir. Hazırlanan PCR karışımı tüplere döküldükten sonra enjektörlerin pistonları takılarak örneğin kolonlardan süzülmesi sağlanmıştır. Enjektörün ağzındaki kolonlar çıkartıldıktan sonra piston geri çekilip kolonlar tekrar yerleştirilmiştir. Tüplere 2 ml %80'lik isopropanol (Sigma, A.B.D.) konularak piston itilmiş ve kolonlardan tüplere toplanmıştır. Kolonlar, eppendorf tüplerine takılıp 20 sn santrifüjlendikten sonra tekrar yeni eppendorf tüplerine takılarak yaklaşık 50 µl distile su konularak maksimum hızda 20 sn santrifugasyon işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen temizlenmiş (pürifiye) PCR ürünleri DNA dizi analizinde kullanılmıştır.

2.9. DNA Dizi Analizi

Çalışmada tespit edilen nükleotid dizilerinin belirlenmesi için otomatize floresanlı DNA dizi analizi cihazı (CEQ 2000XL, Beckman Coulter, ABD.) kullanılmıştır.

- 1- 0,2 µl'lik kuyucuklar içeren plaklar içersine 12µl premiks (2 µl 10×reaksiyon tamponu, 1µl dNTP karışımı, 2 µl ddUTP, 2 µl ddCTP, 2 µl ddATP, 1µl polimeraz enzimi) 6 µl temizlenmiş PCR ürünü, 2 µl primer konularak 'cycle sequencing' gerçekleştirilmiştir. Bunun için plaklar, PCR (Biometra, Almanya) cihazına yerleştirilerek 94°C'de 5 dakika ilk denatürasyonu takiben 30 döngü olacak şekilde 96°C'de 20 saniye denatürasyon, 50°C'de 20 saniye yapışma ve 60°C'de 4 dakikalık uzama reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.
- 2- Program sonlanır sonlanmaz reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucuğa 5 µl durdurma solüsyonu (1,5 M NaOAc'den 2 µl, 50mM EDTA'dan 2 µl, 20 mg/ml'lik glikojenden 1µl) eklenmiştir.
- 3- Yıkama işlemi için, örneklerin üzerine 60 µl %95'lik soğuk etil alkol eklenerek +4°C'de 4000 rpm'de 4 dakika santrifugasyon işlemine tabi tutulmuştur.
- 4- Üstteki sıvı döküldükten sonra kalan örneklerin üzerine %70'lik soğuk etil alkol 200 µl eklenerek +4°C'de 4000 rpm'de 2 dakika santrifugasyon yapılmış ve üstteki kısım dökülmüştür.
- 5- Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra plak 300rpm'e çıkana kadar ters olarak santrifugasyonla fazla etanol uzaklaştırılmıştır.
- 6- Plak daha sonra liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilmiş ve yüksek volüm altında örnekler kurutulmuştur.
- 7- Kuruyan örneklerin üzerine DNA zincirlerini birbirinden ayrı tutmayı sağlayan formamid içeren örnek yükleme solüsyonundan 25 µl konulmuştur.
- 8- Bu örneklerin üzerine mineral yağ damlatılmıştır. Bu şekilde plak içerisindeki örneklerin DNA Dizi Analizi Cihazı içerisinde buharlaşması önlenmiştir.
- 9- Plaklar daha sonra cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar sistemine yerleştirilmiş ve sonuçların çıktıları alınmıştır.
- 10-Elde edilen nükleotid dizileri Gen Bankasından kontrol edilmiştir.

2.10. DNA Analizi (Biyoanaliz)

AP-PCR ile elde edilen bantların büyüklüklerinin tam ve doğru olarak belirlenebilmesi ve PAGE’de gözle göremediğimiz çok büyük ve çok zayıf bantların tespitini sağlamak amacıyla AP-PCR ürünleri biyoanalizörde (Agilent Technologies, A.B.D.) değerlendirmeye alınmıştır (90).

2.10.1. Jel karışımı

+4°C’de saklanan jel içeriği (DNA boya konsantresi ve DNA jel şekillendiricisi) buzdolabından çıkartılarak oda sıcaklığına ulaşması sağlanmıştır .

2.10.2. DNA boya konsantresi

- 1- 25 µl DNA boya konsantresi DNA jel ependorfunun içerisine ilave edilmiştir.
- 2- Hazırlanan solüsyon vortekslenmiş ve filtreden geçirilmiştir.
- 3- 15 dakika 2240 g’de santrifüj edilmiştir. Solüsyon karanlık kutu içersinde ışıktan korunmak üzere saklanmıştır. Hazırlanan solüsyon 4 haftaya kadar tazeliğini korumaktadır.

2.10.3. DNA analiz jeli

- 1- DNA kitine 9 µl hazırlanan jel-boya karışımı konulmuş ve kapağı kapatılmıştır.
- 2- Donması için 1 dakika beklenmiştir. Tekrar 9 µl jel-boya karışımı ilave edilmiştir.
- 3- Kit 4 sıra kuyucuğa sahiptir. Her sırasında 4 tane kuyucuk bulunmaktadır. Sırasıyla ilk 3’üne 1 µl DNA örneği 4. kuyucuğa ise 5 µl marker ilave edilmiştir. Kullanılan kitle bir kerede 12 örnek çalışılmaktadır ve her kit sadece bir kez kullanılmaktadır.
- 4- 2400 rpm’de 1 dakika vortekslenmiştir.
- 5- Hazırlanan kit, testin yapılması için Agilent 2100 (A.B.D.) biyoanaliz cihazına konulmuştur . 15 dakika içerisinde çalışmanın sonucu alınmıştır.

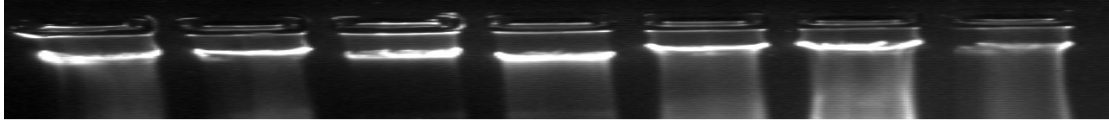
2. 11. İstatiksel Analiz

Gruplar arasındaki farklılığın araştırılmasında, TAD programı içerisinde Ki kare testi kullanılmıştır. P değerinin <0.05 bulunduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. DENEYSEL BULGULAR

3.1. Hasta Örneklerinden İzole Edilen *B. cepacia* Kompleks İzolatlarının Dağılımı

Araştırmada çeşitli klinik örneklerden 89 hastaya ait 93 *Pseudomonas spp.* suşu izole edilmiştir. 93 *Pseudomonas spp.* izolatının 27'si invaziv (kan kültürü izolatu), 69'u noninvaziv (idrar, balgam, vajen, aspirat, göz, yara, boğaz)'dır. Ayrıca API 20NE ile adlandırılan 4 *B. cepacia* kompleks izolatıda çalışılmıştır. Bu izolatlar ise 2 invaziv (kan kültürü izolatu) ve 2 noninvaziv (yara,göz) kültürlerden elde edilmiştir. Örneklerin DNA izolasyonları fenol-kloroform yöntemi ile yapılmış ve %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Resim 3.1.). Örneklere uygulanan moleküler çalışmalar sonucunda ön tanısı *Pseudomonas spp.* olan 93 örneğin 24'ü *B. cepacia* kompleks olarak belirlenmiştir. Klinikte API 20NE ile *B. cepacia* kompleks ön tanısı konan 4 örnek yeniden moleküler olarak değerlendirildiğinde *B. cepacia* kompleks olarak doğrulanmıştır.



Resim 3.1. Ethidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş bakteri izolatlarından fenol- kloroform ile izole edilen DNA görüntüsü (%1 agaroz jel)

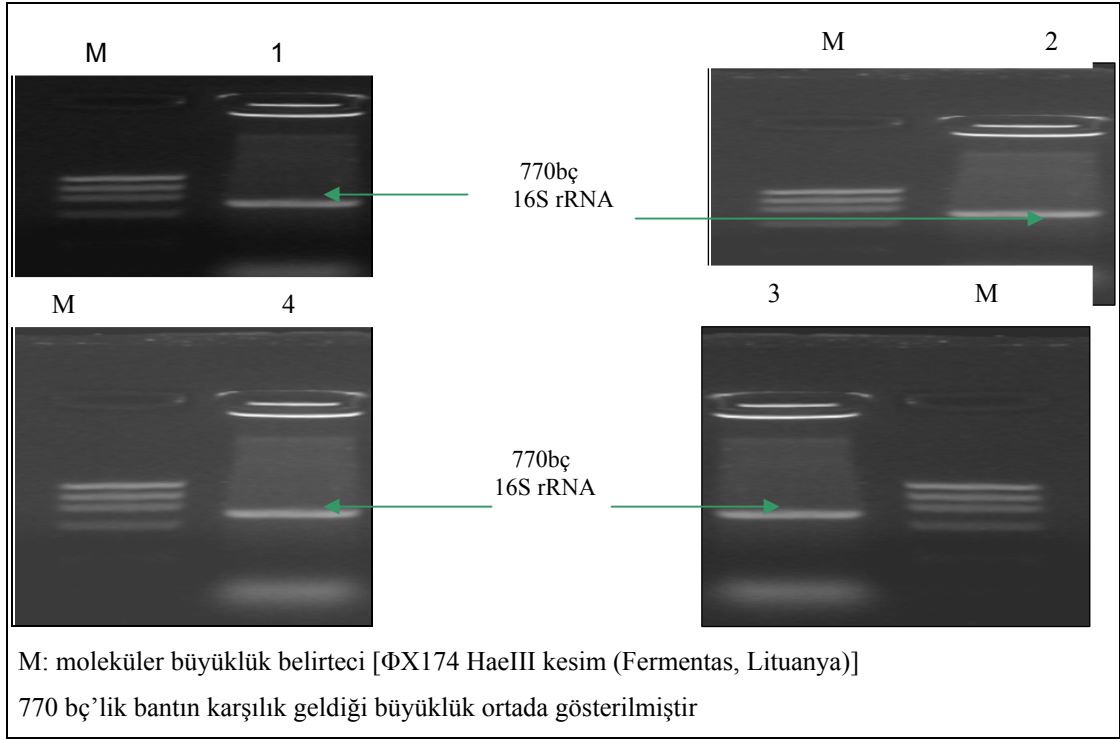
Çizelge 3.1. Çeşitli hasta örneklerinden izole edilen *Pseudomonas spp.* ve *B. cepacia* kompleks izolatlarının dağılımı

Klinik örnekler	<i>Pseudomonas spp.</i>		<i>B. cepacia</i> kompleks		Toplam
Kan	22	(%81,48)	5	(%18,52)	27
Yara	11	(%64,70)	6	(%35,30)	17
İdrar	11	(%91,66)	1	(% 8,34)	12
Aspirat	14	(%73,68)	5	(%26,32)	19
Balgam	9	(%69,23)	4	(%30,77)	13
Vajen	0	0	2	(%100)	2
Göz	0	0	1	(%100)	1
Boğaz	2	(%100)	0	0	2
Toplam	69	(%74,19)	24	(%25,81)	93

Çizelge 3.1’de *B. cepacia* kompleks dağılımlarını incelediğimizde kan kültürlerinden *Pseudomonas spp.* olarak adlandırılan 27 izolatın 5’i (%18.52) *B. cepacia* kompleks, yara kültürlerinden elde edilen 17 *Pseudomonas spp.* izolatından 6’sı (%35.3) *B. cepacia* kompleks, aspirat kültürlerinden izole edilen 19 *Pseudomonas spp.* izolatının 5’i (%26.32) *B. cepacia* kompleks, 13 balgam kültürünün 4’ü (%30.77) *B. cepacia* kompleks ve idrar kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas spp.* izolatının 1’inin (%8,34) *B. cepacia* kompleks izolatı olduğu tespit edilmiştir. Vajen ve göz kültürlerinden elde edilen izolatlarda ise bu oran %100 gibi görünse de değerlendirilen kültür sayısındaki azlık sebebiyle kesin bir şey söylenmesi zordur. Genel sonuçlara bakılacak olursa PCR reaksiyonu sonucunda 770bç’lik ürün 93 *Pseudomonas spp.* izolatının içerisinde 24 *B. cepacia* kompleks suşu tespit edilmiştir ki bu oran %25,81’e karşılık gelmektedir.

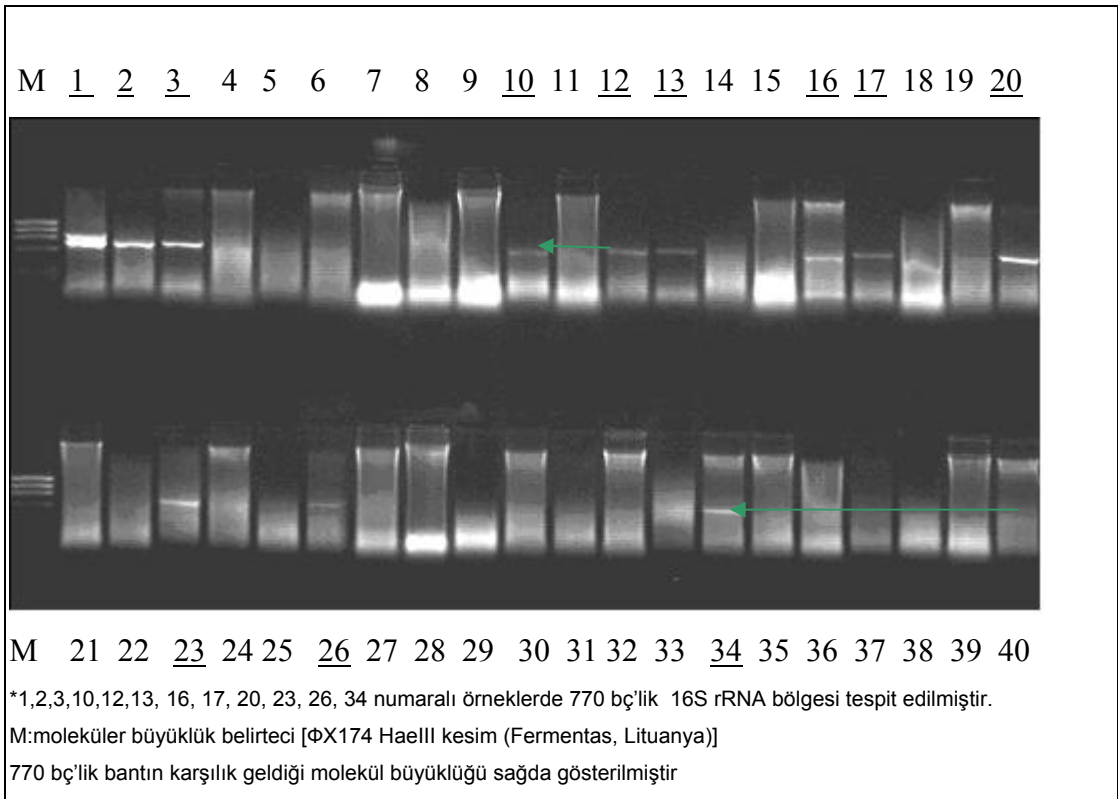
3.2. *B. cepacia* Kompleks İzolatlarının PCR İdentifikasyonu

B. cepacia kompleks olarak adlandırılan izolatların moleküler identifikasyonu için PC480-PC1250 sentetik oligonükleotid primerleri kullanılmış ve bakterilerin PCR tabanlı moleküler yöntem ile kontrolü yapılmıştır. *B. cepacia* kompleks suşları için kullanılan sentetik oligonükleotid primerlerin 770 bç’lik 16S rRNA bölgesine bağlanarak PCR reaksiyonunu gerçekleştirdiği %1’lik agaroz jel elektroforezinde tespit edilmiştir. *B. cepacia* kompleks suşlarının PC480 ve PC1250 primerleri ile yapılan PCR sonuçları Resim 3.1.’de görülmektedir. Çalışmada API20NE ticari testi sonucunda adlandırılan *B. cepacia* kompleks örneklerine uygulanan PCR yönteminin, bakterinin identifikasyonunda istenilen bölgenin çoğaltulmasını sağlayarak başarılı bir sonuç verdiği belirlenmiştir.

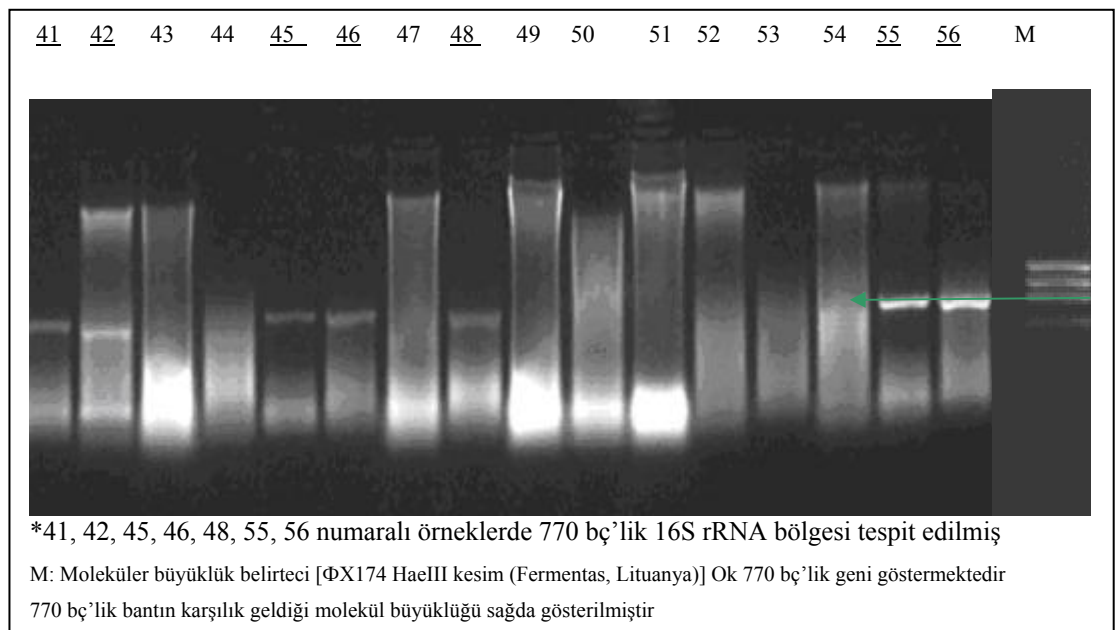


Resim 3.2. PC480-PC1250 sentetik oligonükleotid primerleri ile çoğaltılan *B. cepacia* kompleks PCR ürünü Ethidyum bromid (Sigma, A.B.D.) ile boyanarak UV altında görüntülenmiştir (%1 agaroz jel).

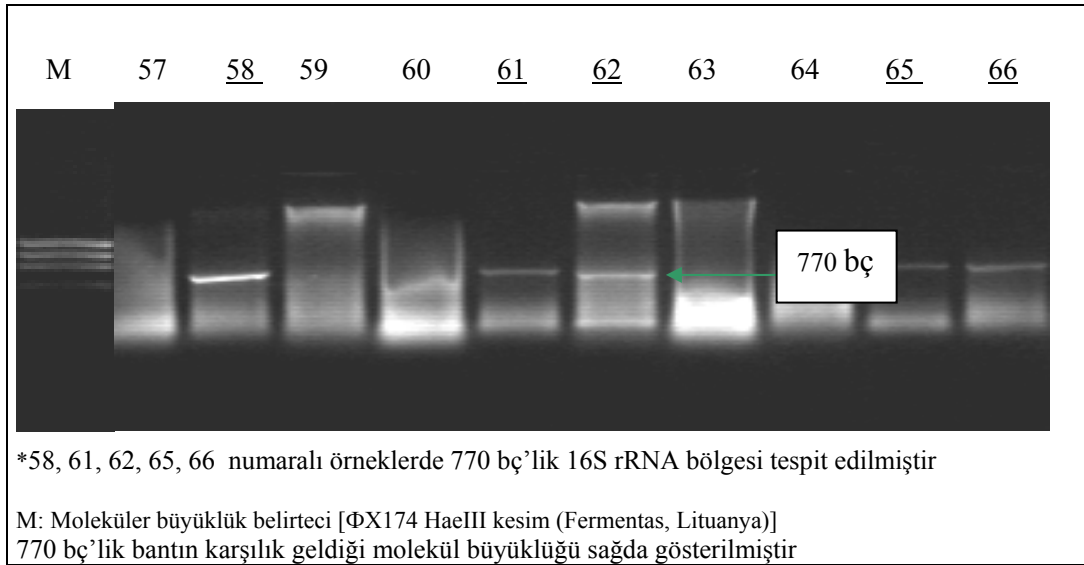
Aynı sentetik oligonükleotit primerleri ile 770 bç'lik 16S rDNA gen bölgesinin PCR'la çoğaltılması sonucunda 93 *Pseudomonas spp.* izolatının 24 tanesinde *B. cepacia* kompleks'ine ait 770 bç'lik bölgenin varlığı tespit edilmiştir ve oluşan ürünler Resim 3.2., 3.3. ve 3.4.'de gösterilmiştir.



Resim 3.3. *Pseudomonas spp.* suşlarının PC480-PC1250 primerleri ile elde edilen PCR ürünleri. Örnekler Ethidyum bromid (Sigma, A.B.D.) ile UV altında görüntülenmiştir (%1 agaroz jel).



Resim 3.4. *Pseudomonas spp.* suşlarının PC480-PC1250 primerleri ile elde edilen PCR ürünleri ethidyum bromid (Sigma, A.B.D.) ile UV altında görüntülenmiştir (%1 agaroz jel).



Resim 3.5. *Pseudomonas spp.* suşlarının PC480-PC1250 primerleri ile elde edilen PCR ürünleri ethidyum bromid (Sigma, A.B.D.) ile UV altında görüntülenmiştir (%1 agaroz jel)

3.3. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Örneklerin Doğrulanması

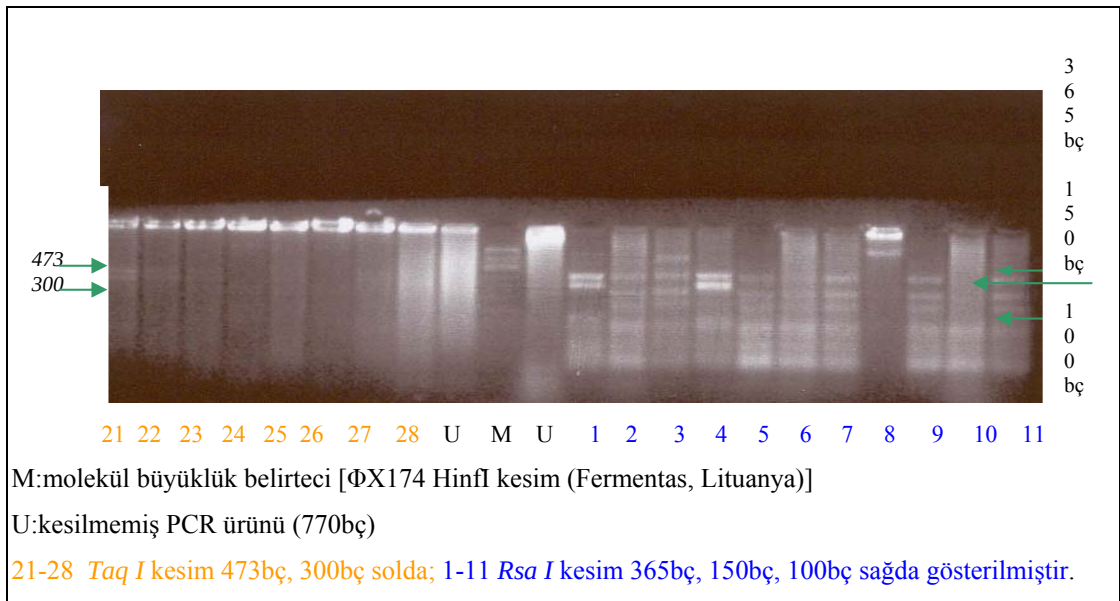
Çalışmada PCR'la elde ettiğimiz 770 bç'lik 16S rRNA gen bölgesini içeren ürünlerin doğrulanması için restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştır. Toplam 28 *B. cepacia* kompleks örneğinin nükleotid dizisine uygun olarak gen bankasından belirlediğimiz *Taq I*, *Rsa I* ve *Tsp 509I* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile dizi üzerinde bulunması gereken enzim kesim noktaları tespit edilmiştir.

3.3.1. *Taq I* restriksiyon endonükleaz enzim sonuçları

TaqI restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak yapılan doğrulama analizi sonucunda 28 *B. cepacia* kompleks izolatının 17'sinde 473 bç ve 300 bç büyüklüğündeki kesim bantları tespit edilmiştir (Resim 3.6 ve Resim 3.7). *B. cepacia* kompleks izolatlarının 11'inde kesim bantlarının olmadığı belirlenmiştir. İzolatların bu bölgelerinde bir mutasyon olabileceği düşünülmüştür.



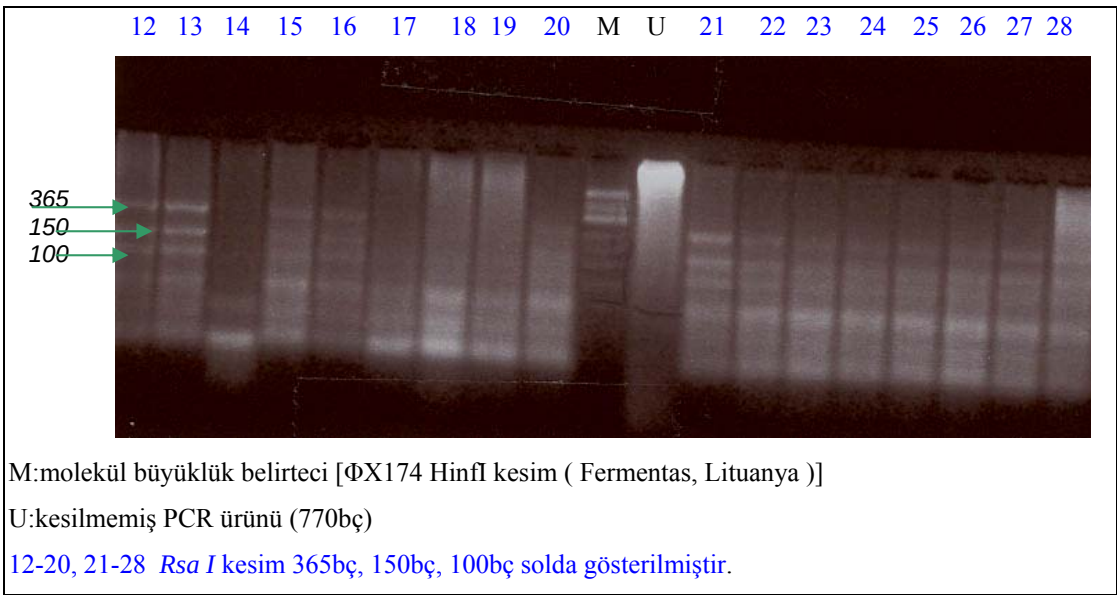
Resim 3.6. Ethidyum bromid (Sigma, A.B.D.) ile UV altında görüntülenen *B. cepacia* kompleks izolatlarının *Taq I* enzim ile kesimi. (%2 agaroz jel)



Resim 3.7. Ethidyum bromid (Sigma, A.B.D.) ile UV altında görüntülenen *B. cepacia* kompleks izolatlarının *Taq I* ve *Rsa I* enzimi ile kesimi (%2 agaroz jel)

3.3.2. *Rsa I* restriksiyon endonükleaz sonuçları

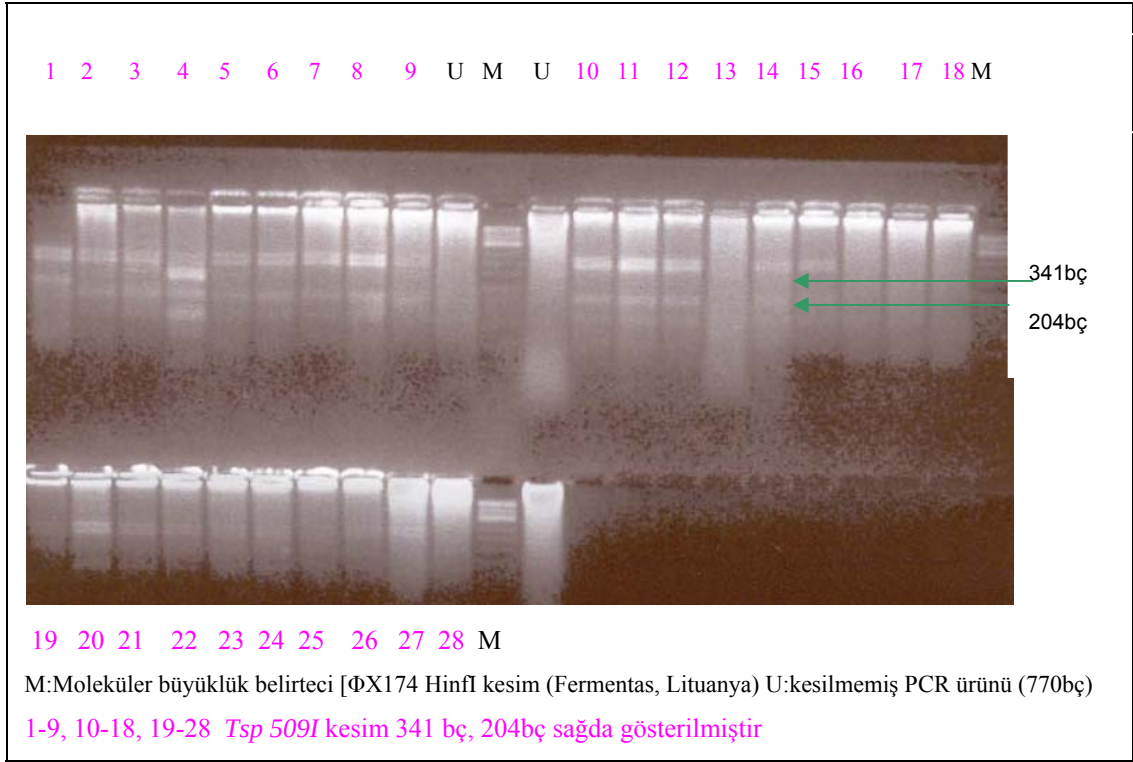
Rsa I restriksiyon endonükleaz analizi sonucunda *B. cepacia* kompleks izolatlarının tümünün 365bç, 150 bç ve 100 bç'lik kesim ürünlerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Resim 3.7 ve Resim 3.8)



Resim 3.8. Ethidyum bromid (Sigma, A.B.D.) ile UV altında görüntülen *B. cepacia* kompleks izolatlarının *RsaI* enzim kesimi (%2 agaroz jel)

3.3.3. *Tsp 509I* restriksiyon endonükleaz sonuçları

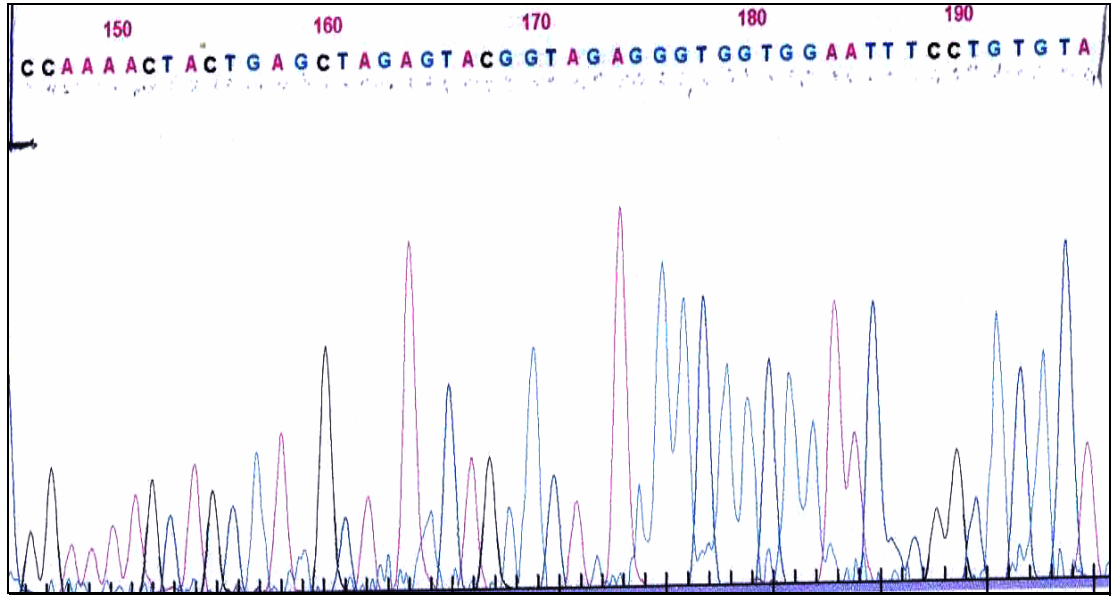
Tsp 509I restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak yapılan doğrulama analizi sonucunda ise 341 bç ve 204 bç büyüklüğündeki kesim bantlarına 28 *B. cepacia* kompleks izolatının 23'ünün sahip olduğu gözlenmiştir geriye kalan 5 izolatla bu bölgeler tespit edilememiştir. Yine bir mutasyon sonucunda bu bölgelerdeki kesim bantlarının kalktığı düşünülmektedir (Resim 3.9).



Resim 3.9. Ethidyum bromid (Sigma, A.B.D.) ile UV altında görüntülenen *B. cepacia* kompleks izolatlarının *Tsp* 509I enzim kesimi (%2 agaroz jel)

3.4. DNA Dizi Analizi

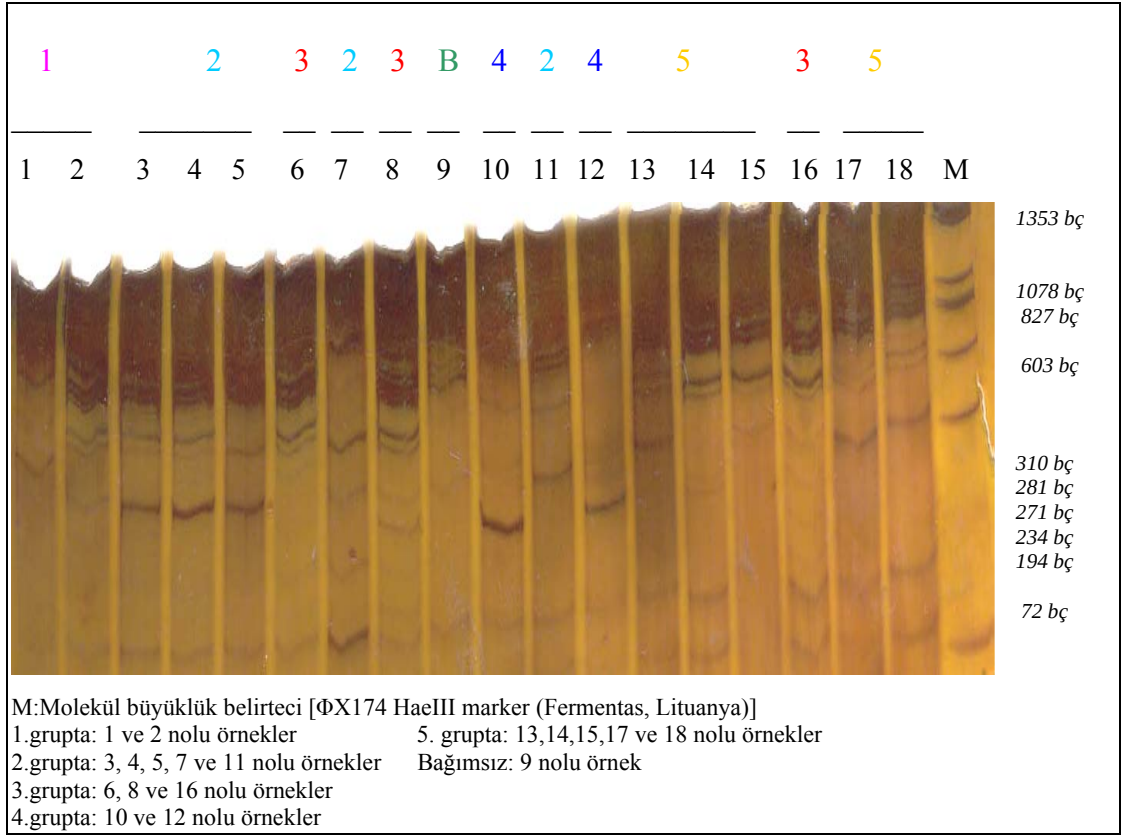
Çalışmada restriksiyon endonükleaz enzimleri ile doğrulanan *B. cepacia* kompleks izolatlarının nükleotid dizilerinin elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla enzimle kesim noktaları ortadan kalkmayan *B. cepacia* kompleks izolatları arasından rastgele seçilen 4 örneğe DNA dizi analizi uygulanmıştır. DNA dizi analizi sonucunda *B. cepacia* kompleks izolatlarından tespit edilen nükleotid dizisi ile gen bankasında kayıtlı olan *B. cepacia* kompleks (AY207313) nükleotid dizisi karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırma sonucunda PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 770bç'lik gen bölgesinin nükleotid dizisi ile *B. cepacia* kompleks (AY207313) nükleotid dizisinin birbirinin aynı olduğu tespit edilmiştir.



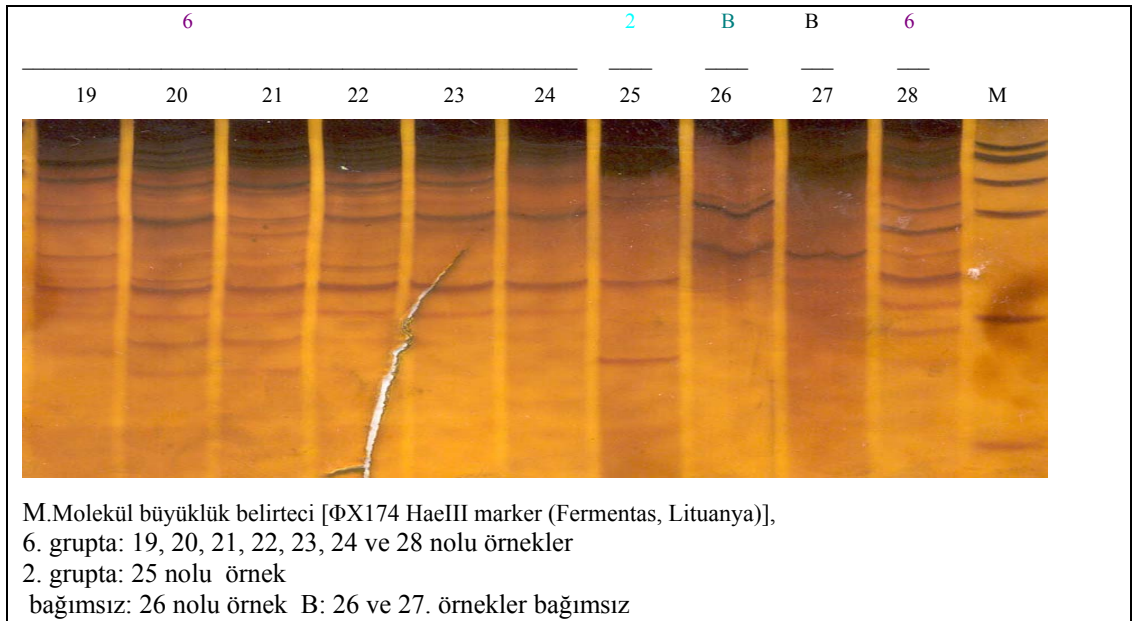
Şekil 3.1. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile doğrulanan *B. cepacia* kompleks izolatlarına ait DNA dizi analizi sonucu

3.5. AP-PCR ile 28 *B. cepacia* Kompleks İzolatlarının Bant Yapısı

PCR, restriksiyon endonükleaz enzimi ile doğrulama ve DNA dizi analizini kullanarak tespit edilen 28 *B. cepacia* kompleks izolatının moleküler tiplendirilmesi için izolatlara AP-PCR yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde izolatlara uygulanacak olan PCR çoğaltmasında AP1 sentetik oligonükleotid primeri seçilerek kullanılmıştır. 28 *B.cepacia* kompleks suşunun AP-PCR ürünü %12'lik poliakrilamid jel (PAGE) elektroforezinde değerlendirilmiştir. Hazırlanan poliakrilamid jel (PAG) düzeneğe (20cm×20cm) boyutlarında (Owl Scientific, A.B.D.) yerleştirilmiştir. PAG'ın üzerindeki kuyucuklara AP-PCR ürününden 18 µl konulmuştur ve 120 volt, 80 mA ve 10 watt'ta 4-5 saat yürütülmüştür. PAG üzerinde meydana gelen bantların görünür hale gelebilmesi için gümüş boyama tekniği kullanılarak renklendirilmiştir. Daha sonra görünür hale gelen AP-PCR bantlarının yapısını tespit etmek için PAG negatoskop üzerine alınmıştır. PAG'ın değerlendirilmesi sonucunda örneklerin birbirinden farklı 6 gruba ayrıldığı tespit edilmiştir. Gruplar 1-6 arasında numaralandırılmış Resim 3.10 ve Resim 3.11'de gösterilmiştir.



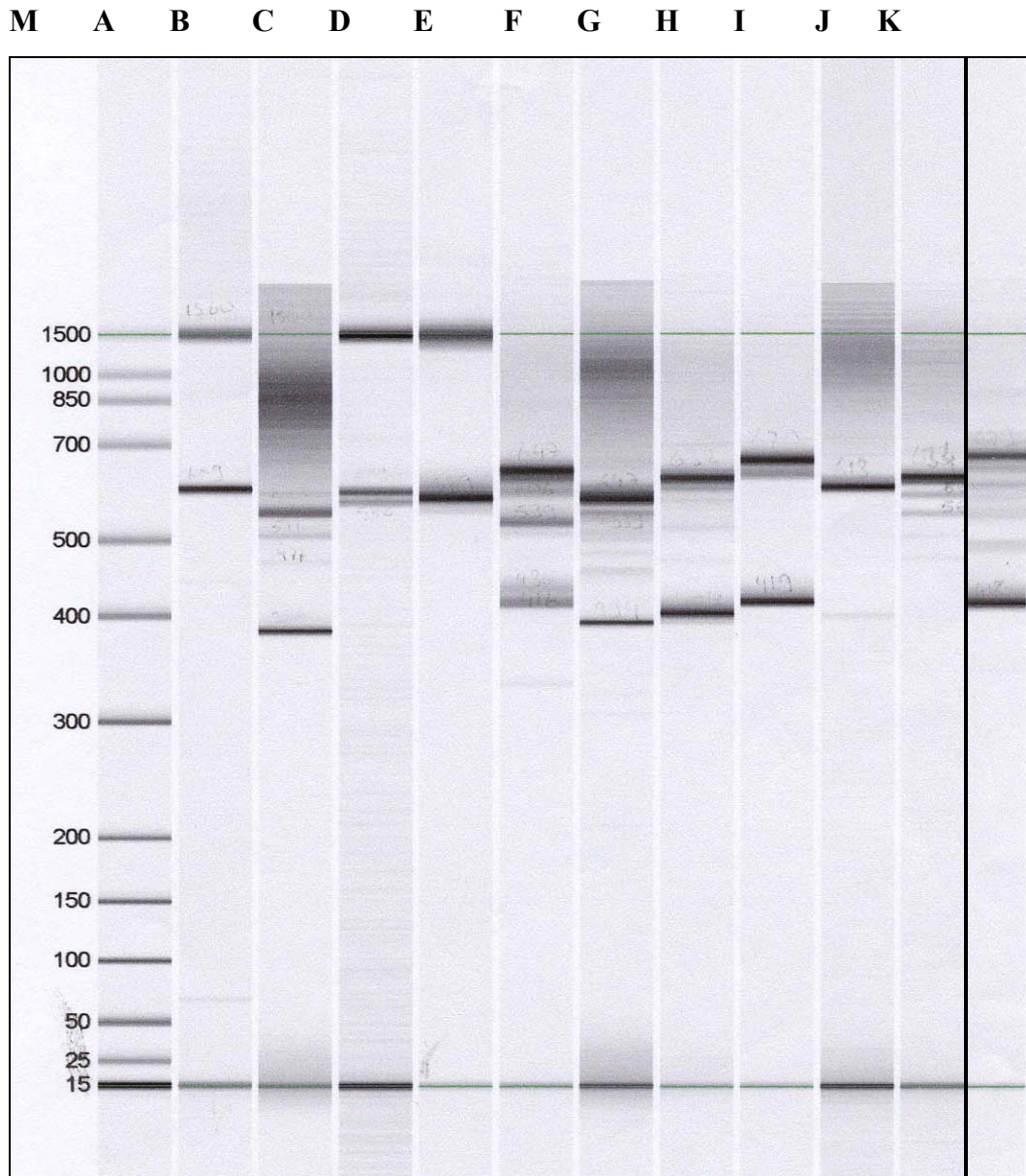
Resim 3.10. Gümüş boyama ile görüntülenen *B. cepacia* kompleks izolatlarının AP- PCR ürünleri



Resim 3.11. Gümüş boyama ile görüntülenen *B. cepacia* kompleks izolatlarının AP-PCR ürünleri.

3.6. *B. cepacia* Kompleks İzolatlarının AP-PCR Ürün Biyoanalizi

AP-PCR ürünlerinin PAGE’de değerlendirilmesi sırasında büyüklüğü belirlenemeyen çok güçlü ve zayıf bantların olduğu tespit edilmiştir. AP-PCR sonrası meydana gelen çoğaltma ürünlerinin oluşturduğu bantların sayılarını ve bant büyüklüğünü tespit etmek için Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies / Kanada) cihazı kullanılarak değerlendirmeleri yapılmıştır. Biyoanalizör analiz sonuçlarının bu cihazdan elde edilen jel görüntüsü Resim 3.11’de gösterilmiştir. Ayrıca biyoanalizör sonuçları grafik ve bant büyüklüklerinin sayısal ölçümü olarak da alınmıştır ve sonuçlar Şekil 3.12 ile Şekil 3.23 arasında gösterilmiştir. Elde edilen tüm sonuçların değerlendirme işlemini kolaylaştıracağı düşünülerek 11 farklı bant büyüklüğüne sahip olan gruplar A-K harfleri arasında isimlendirilmiştir (Resim 3.12).



Resim 3.12. AP-PCR ürünlerinin biyoanalizör analizi (Agilent Technologies, A.B.D.)
jel görüntüsü

28 *B. cepacia* kompleks izolatına ait olan AP-PCR tiplendirme sonuçları ile Resim 3.12’de gösterilen Biyoanalizör analiz sonuçlarına göre A-K gruplarının sahip olduğu bant büyüklükleri Çizelge 3.2’de karşılaştırılmıştır. Bu çizelgeye göre biyoanalizör sonuçları doğrultusunda gruplar arasında bant büyüklüğü farklılıkları tespit edilmiştir. Ayrıca AP-PCR sonuçlarına göre oluşturulan grupların bant büyüklüklerinin kesin olarak tespit edilemediği ve daha genel sonuçları içerdiği belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. 28 *B. cepacia* kompleks izolalarının AP-PCR ve Biyoanalizör Analiz bant büyüklüğü sonuçlarının karşılaştırılması

Örnekler	Örneklerin alındığı tarihler (gün/ay/yıl)	AP-PCR sonuçları	Biyoanalizör Analiz sonuçları	Meydana gelen bantların büyüklükleri (bp)
göz	24.03.03	II	A	68,609
göz	31.03.03	bağımsız	A	68,609
idrar	25.03.03	bağımsız	C	582,603
kan	26.03.03	III	C	582,603
kan	01.04.03	I	B	386,511,560,599,637,671,694,738,769,791,816,850,875,925,1301
kan	01.04.03	I	D	565,589,971,1213
kan	02.04.03	II	B	386,511,560,599,637,671,694,738,769,791,816,850,875,925,1301
kan	03.04.03	II	B	386,511,560,599,637,671,694,738,769,791,816,850,875,925,1301
kan	03.04.03	II	D	565,589,971,1213
kan	07.03.03	II	E	336,416,436,515,539,606,647,699,736,753,785,832,932,982,1051,1154,1235,1386,1441
vajen	08.03.03	III	E	336,416,436,515,539,606,647,699,736,753,785,832,932,982,1051,1154,1235,1386,1441
vajen	21.05.03	III	B	386,511,560,599,637,671,694,738,769,791,816,850,875,925,1301
balgam	22.05.03	V	F	40,394,519,545,560,588,655,666,686,702,751,785,842,868,989,1051,1162,1301,1404
balgam	23.05.03	V	F	40,394,519,545,560,588,655,666,686,702,751,785,842,868,989,1051,1162,1301,1404
balgam	23.05.03	V	G	28,32,404,473,526,553,567,584,612,632,693,702,734,749,765,789,822,844,929
balgam	24.05.03	VI	F	40,394,519,545,560,588,655,666,686,702,751,785,842,868,989,1051,1162,1301,1404
aspirat	03.10.03	IV	G	28,32,404,473,526,553,567,584,612,632,693,702,734,749,765,789,822,844,929
aspirat	07.10.03	VI	H	22,419,599,642,670,759,779,816,850,896,950,1000,1162,1243,1390
aspirat	08.10.03	IV	H	22,419,599,642,670,759,779,816,850,896,950,1000,1162,1243,1390
aspirat	10.10.03	bağımsız	I	613,812,846,950,1000,1066,1154,1213,1360
aspirat	03.12.03	V	I	613,812,846,950,1000,1066,1154,1213,1360
yara	11.12.03	II	J	557,597,634,685,805,826,857,886,939,989,1037,1147,1287,1412
yara	29.12.03	V	J	557,597,634,685,805,826,857,886,939,989,1037,1147,1287,1412
yara	02.01.04	VI	K	349,418,455,489,497,553,565,592,618,653,679,710,783,842,9001118,1206,1316,1441
yara	09.01.04	VI	K	349,418,455,489,497,553,565,592,618,653,679,710,783,842,9001118,1206,1316,1441
yara	24.02.04	VI	B	386,511,560,599,637,671,694,738,769,791,816,850,875,925,1301
yara	16.02.04	VI	B	386,511,560,599,637,671,694,738,769,791,816,850,875,925,1301
yara	22.03.04	VI	B	386,511,560,599,637,671,694,738,769,791,816,850,875,925,1301

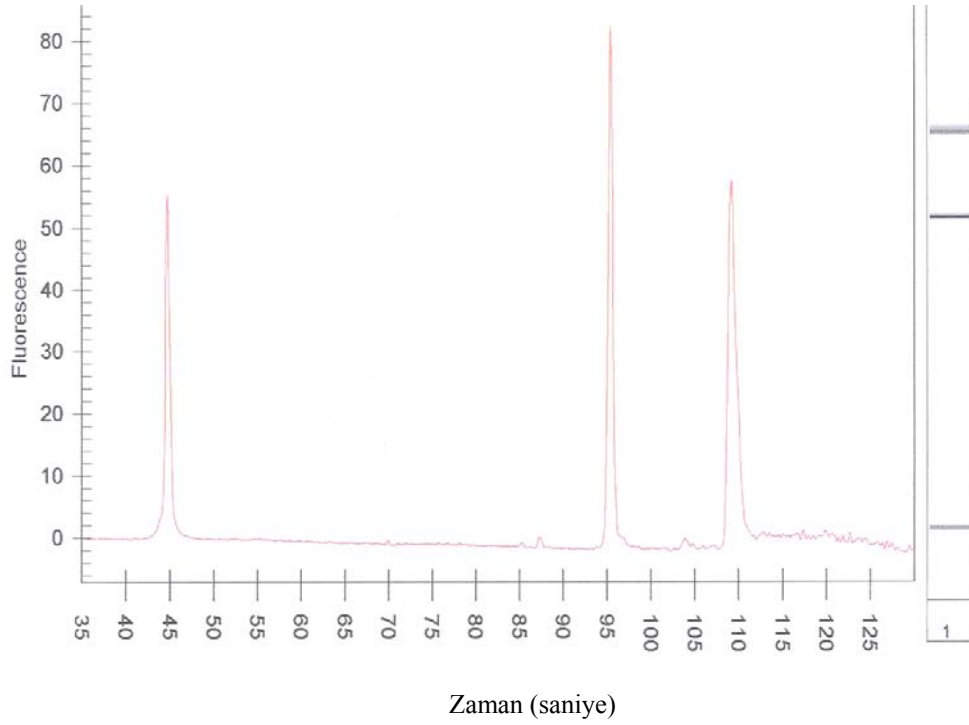
Çalışmada *B. cepacia* kompleks izolatlarının AP-PCR ile elde edilen bant büyüklüklerinin tam ve doğru belirlenebilmesi amacıyla AP-PCR ürünleri biyoanalizörde (Agilent Technologies, A.B.D.) değerlendirmeye alınmıştır. Bu cihazla çoğaltma ürünlerinin DNA parçalarının sayısal büyüklüğü ölçülmüştür. Aynı zamanda Şekil 3.13 ve Şekil 3.23 arasında gösterilen grafiksel sonuçlarla jel görüntüsü ve Çizelge 3.3 ile Çizelge 3.13 arasında gösterilen bant büyüklüğü sayısal sonuçlarını da bu görüntülere ilave olarak alınabilmesi çalışmada sonuçların karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır. Bu nedenlerle kullanışlı bir sistem olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Biyoanalizör Analizinde kullanılan markerın bant büyüklüğü, konsantrasyonu ve molaritesi

Tepe sayısı	ulaştığı süre saniye	korelasyon bölgesi	bant bç	konsantrasyon ng/ul	molarite nmol/l	
1*	43.05	30.50	15	4.2	424.24	Lower Marker
2	45.10	31.00	25	2.0	121.21	Ladder
3	48.40	32.00	50	2.0	60.61	Ladder
4	53.60	35.00	100	2.0	30.30	Ladder
5	58.60	37.50	150	2.0	20.20	Ladder
6	64.00	40.00	200	2.0	15.15	Ladder
7	73.80	41.50	300	2.0	10.10	Ladder
8	82.75	42.00	400	2.0	7.58	Ladder
9	89.15	42.00	500	2.0	6.06	Ladder
10	97.20	42.00	700	2.0	4.33	Ladder
11	101.00	42.00	850	2.0	3.57	Ladder
12	103.10	41.50	1000	2.0	3.03	Ladder
13*	106.50	37.00	1500	2.1	2.12	Upper Marker

Çizelge 3.4. A grubu olarak adlandırılan *B. cepacia* kompleks izolatlarının bant büyüklüğü (bç) ölçüm sonuçları

Tepe sayısı	ulaştığı süre saniye	korelasyon bölgesi	bant bç	konsantrasyon ng/ul	molarite nmol/l	
1*	43.05	82.70	15	4.2	424.24	Lower Marker
2	50.30	4.28	68	0.14	3.18	
3	93.55	76.92	609	2.0	5.04	
4*	106.50	66.82	1500	2.1	2.12	Upper Marker
5	115.40	1.60				

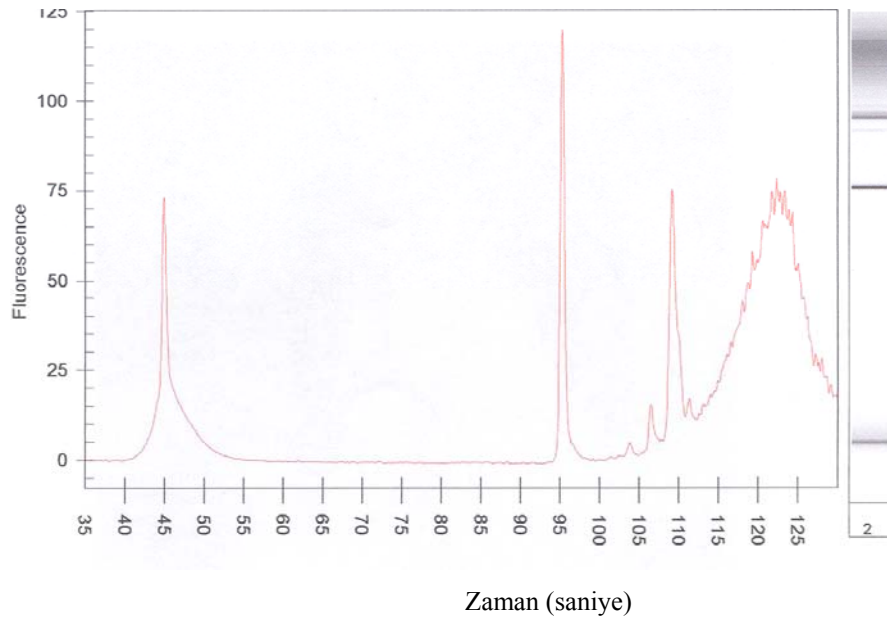


Şekil 3.13. 3 ve 9 nolu *B. cepacia* kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü.

Yukarıda göz kültürlerinden PCR tekniği ile identifikasyonu yapılan 2 *B. cepacia* kompleks izolatının grafik, jel ve bant ölçüm sonuçları verilmiştir. Tespit edilen sonuçlar doğrultusunda bu grupta meydana gelen bantların büyüklükleri 68 bç - 609 bç olarak belirlenmiştir ve A grubu olarak adlandırılmıştır. AP-PCR moleküler tiplendirmesinde ise 31.03.03 tarihinde alınan kültürden identifiye edilen *B.cepacia* kompleks izolatının bağımsız, 24.03.03 tarihinde alınan kültürden identifiye edilen izolatın II.grup üyesi olduğu belirlenmiştir. (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.5. B grubu olarak adlandırılan *B. cepacia* kompleks izolatlarının bant büyüklüğü (bç) ölçüm sonuçları

Tepe sayısı	ulaştığı süre	korelasyon bölgesi	bant	konsantrasyon	molarite	
	Saniye		bç	ng/ul	nmol/l	
1*	43.05	354.24	15	4.2	424.24	Lower Marker
2	81.50	102.23	386	13.8	54.26	
3	89.60	6.93	511	0.94	2.77	
4	91.55	79.58	560	10.7	29.08	
5	93.15	10.10	599	1.4	3.45	
6	94.65	10.69	637	1.4	3.43	
7	96.05	24.90	671	3.4	7.58	
8	96.95	23.75	694	3.2	7.00	
9	98.15	46.44	738	6.3	12.88	
10	98.95	48.48	769	6.5	12.89	
11	99.50	39.97	791	5.4	10.34	
12	100.15	78.90	816	10.7	19.76	
13	101.00	73.00	850	9.9	17.57	
14	101.35	67.16	875	9.1	15.73	
15	102.05	183.77	925	25.0	40.88	
16	105.15	22.85	1301	3.4	4.00	Upper Marker
17*	106.50	13.05	1500	2.1	2.12	
18	108.05	2.38				
19	110.45	1.30				

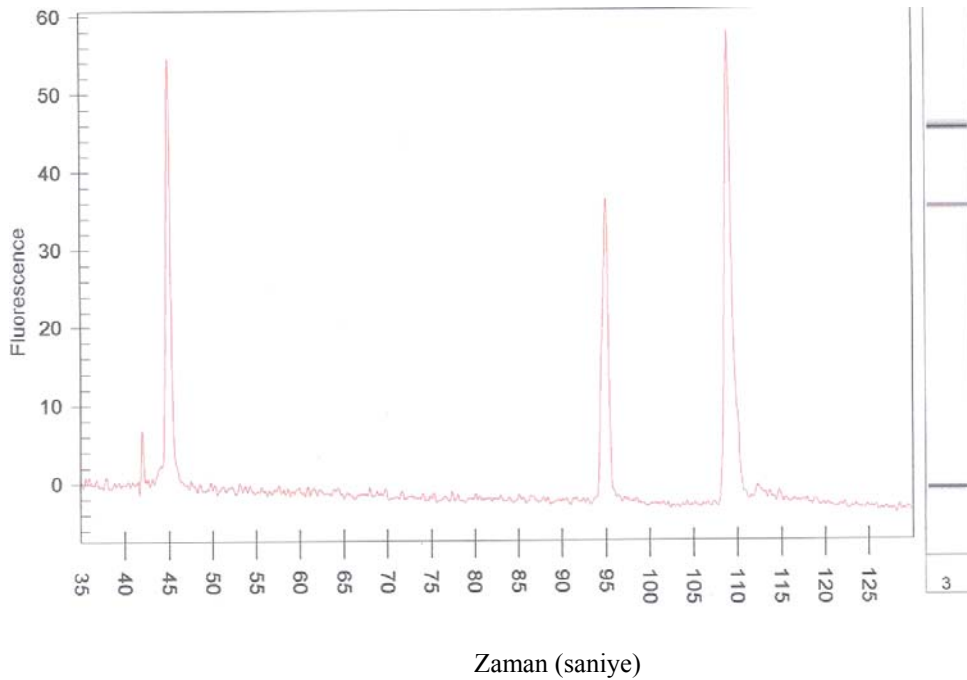


Şekil 3.14. 1, 4, 5, 6, 19, 20 ve 21 nolu *B.cepacia* kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü.

Biyoanalizörde elde edilen grafik, jel ve bant ölçüm sonuçlarına göre, B grubunda yer aldığı belirlenen *B. cepacia* kompleks izolatlarının dağılımı 3 kan, 1 vajen ve 1 yara'dır. Bu örneklerin biyoanalizörde meydana getirdiği bantların büyüklükleri 386 bç – 1301 bç arasında ölçülmüştür. Aynı *B. cepacia* kompleks izolatlarının AP-PCR'de meydana gelen moleküler bantlarına göre gruplandırılmalarında örneklerin 4 gruba (kan izolatları I. grup, vajen izolatı III. grup, yara izolatı I. grup ve VI. grup) dağıldığı tespit edilmiştir (Tablo 3.1.)

Çizelge 3.6. C grubu olarak adlandırılan *B. cepacia* kompleks izolatlarının bant büyüklüğü (bç) ölçüm sonuçları

Tepe sayısı	ulaştığı süre saniye	korelasyon bölgesi	bant bç	konsantrasyon ng/ul	molarite nmol/l	
1*	43.05	85.10	15	4.2	424.24	Lower Marker
2	92.45	13.61	582	0.41	1.07	
3	93.30	28.60	603	0.86	2.16	
4*	106.50	58.51	1500	2.1	2.12	Upper Marker

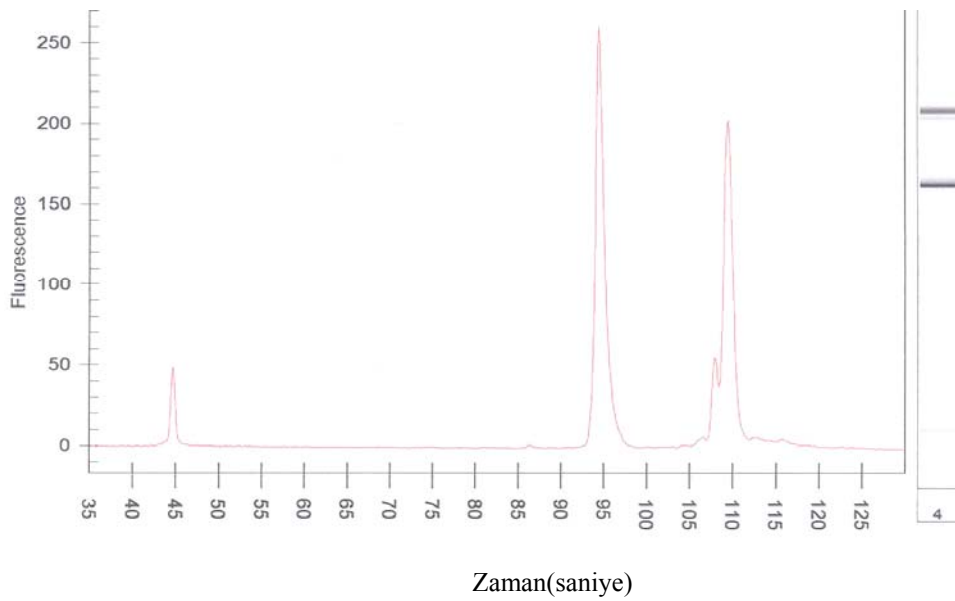


Şekil 3.15. 8 ve 26 nolu *B. cepacia* kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü.

İdrar ve kan kültüründen PCR ile identifiye edilen *B. cepacia* kompleks izolatının biyoanalizör sonucunda bant büyüklüğü 582 bç- 603 bç olarak tespit edilmiştir ve C grubu olarak adlandırılmıştır. İdrar izolatı *B. cepacia* kompleks AP-PCR sonucuna göre ise bu izolat bağımsız olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Kan kültürü izolatı AP-PCR’de III.grup üyesi olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.7. D grubu olarak adlandırılan *B. cepacia* kompleks izolatlarının bant büyüklüğü (bç) ölçüm sonuçları

Tepe sayısı	ulaştığı süre saniye	korelasyon bölgesi	bant bç	konsantrasyon ng/ul	molarite nmol/l	
1*	43.05	84.48	15	4.2	424.24	Lower Marker
2	91.75	20.57	565	0.11	0.30	
3	92.75	402.50	589	2.2	5.64	
4	102.70	4.33	971	0.02	0.0372	
5	104.55	7.74	1213	0.05	0.0569	
6*	106.50	323.49	1500	2.1	2.12	Upper Marker
7	109.45	4.09				
8	109.90	6.87				
9	110.75	6.10				
10	111.65	3.31				
11	112.50	4.02				
12	113.00	6.39				
13	113.95	3.37				

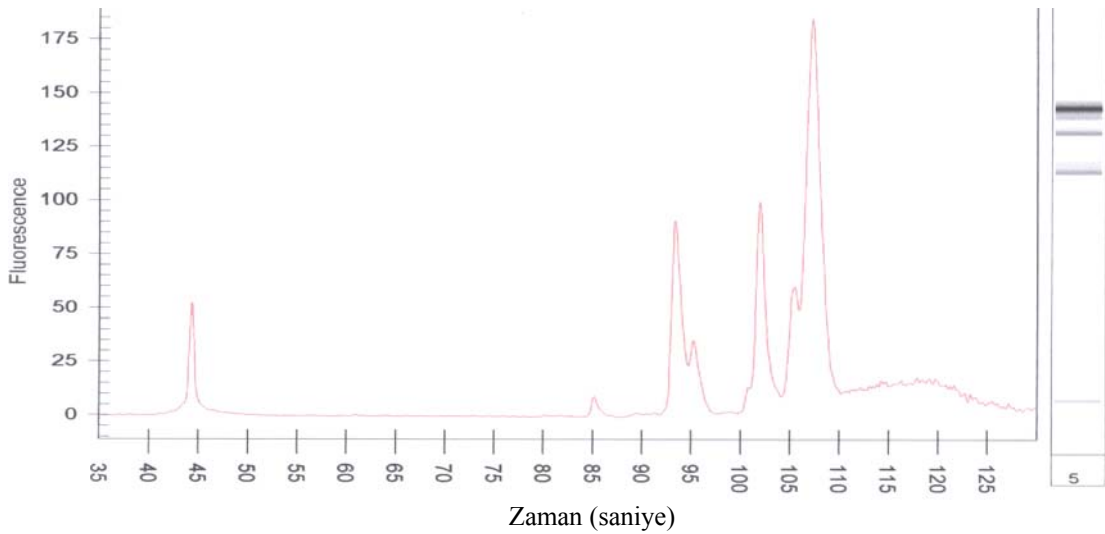


Şekil 3.16. 2 ve 7 nolu *B. cepacia* kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü.

Bant büyüklüklerinin 565 bç – 1213 bç arasında değişen ve D harfi ile adlandırılan bu grupta kan kültüründen PCR ile identifiye edilen 2 *B. cepacia* kompleks izolatu tespit edilmiştir. Bu izolatların AP-PCR değerlendirmesinde I. grup üyesi oldukları belirlenmiştir.

Çizelge 3.8. E grubu olarak adlandırılan *B. cepacia* kompleks izolatlarının bant büyüklüğü (bç) ölçüm sonuçları

Tepe sayısı	ulaştığı süre saniye	korelasyon bölgesi	bant bç	konsantrasyon ng/ul	molarite nmol/l	
1*	43.05	109.02	15	4.2	424.24	Lower Marker
2	77.00	10.26	336	2.1	9.52	
3	83.80	124.57	416	25.4	92.45	
4	85.05	55.44	436	11.3	39.30	
5	89.75	11.66	515	2.4	7.00	
6	90.70	131.23	539	26.8	75.31	
7	93.40	68.62	606	14.0	35.02	
8	95.05	341.14	647	69.6	163.04	
9	97.15	9.35	699	1.9	4.14	
10	98.10	6.89	736	1.4	2.90	
11	98.55	11.67	753	2.4	4.79	
12	99.35	6.86	785	1.4	2.70	
13	100.55	29.42	832	6.0	10.92	
14	102.15	14.36	932	2.9	4.79	
15	102.85	7.68	982	1.6	2.44	
16	103.45	15.08	1051	3.2	4.56	
17	104.15	8.57	1154	1.9	2.44	
18	104.70	12.62	1235	2.8	3.44	
19	105.60	7.03	1368	1.6	1.81	
20	106.10	6.43	1441	1.5	1.61	
21*	106.50	8.64	1500	2.1	2.12	Upper Marker
22	107.30	4.30				

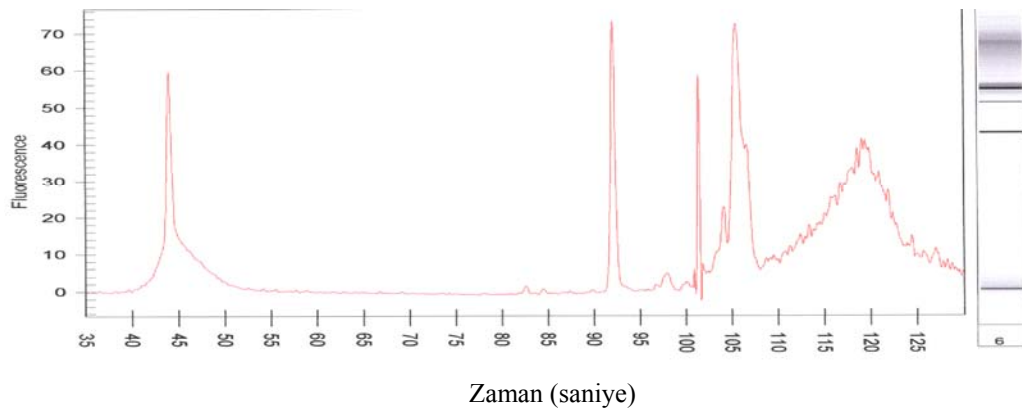


Şekil 3.17. 11 ve 16 nolu *B. cepacia* kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü.

E grubunun üyeleri kan ve vajen kültüründen PCR ile identifiye edilen *B. cepacia* kompleksi izolatlarıdır. İzolatların biyoanalizörde meydana getirdiği bant büyüklüklerinin 336 bç – 1441 bç arasında değiştiği tespit edilmiştir. Kan kültürü izolatu *B. cepacia* kompleksin AP-PCR’de II.grup üyesi, vajen kültürü izolatu *B. cepacia* kompleks AP-PCR’de III. grup üyesi olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.9. F grubu olarak adlandırılan *B. cepacia* kompleks izolatlarının bant büyüklüğü (bç) ölçüm sonuçları

Tepe sayısı	ulaştığı süre saniye	korelasyon bölgesi	bant bç	konsantrasyon ng/ul	molarite nmol/l	
1*	43.05	240.94	15	4.2	424.24	Lower Marker
2	47.05	4.52	40	1.3	49.76	
3	82.25	47.30	394	10.3	39.51	
4	89.90	3.81	519	0.83	2.42	
5	90.95	6.56	545	1.4	3.97	
6	91.55	17.11	560	3.7	10.07	
7	92.70	120.95	588	26.3	67.70	
8	95.40	3.94	655	0.86	1.98	
9	95.85	5.69	666	1.2	2.81	
10	96.65	3.07	686	0.67	1.47	
11	97.25	3.96	702	0.86	1.86	
12	98.50	5.99	751	1.3	2.62	
13	99.35	10.25	785	2.2	4.30	
14	100.80	15.13	842	3.3	5.91	
15	101.25	26.37	868	5.7	10.02	
16	102.95	31.92	989	7.0	10.74	
17	103.45	39.36	1051	8.8	12.67	
18	104.20	26.53	1162	6.1	8.00	
19	105.15	26.51	1301	6.4	7.47	
20	105.85	10.92	1404	2.7	2.95	
21*	106.50	8.11	1500	2.1	2.12	Upper Marker
22	107.20	3.44				

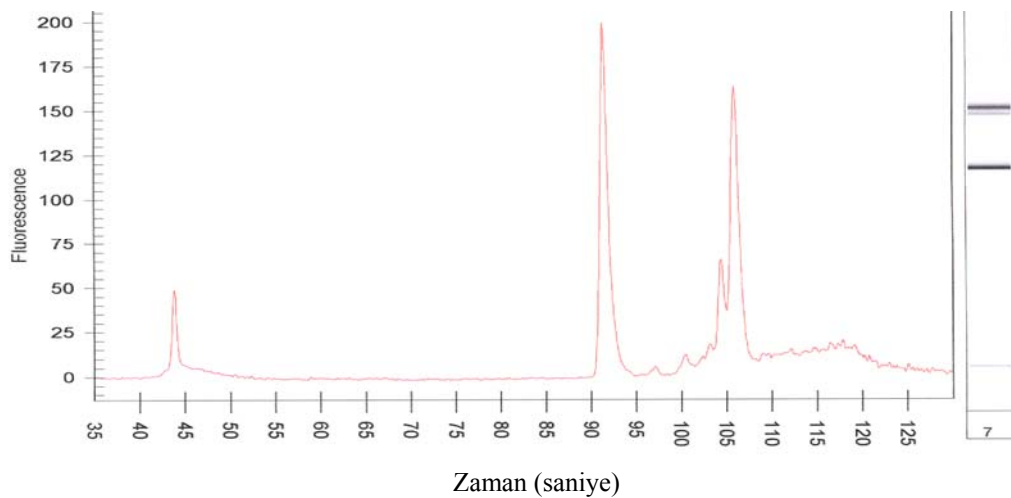


Şekil 3.18. 13, 14 ve 22 nolu *B. cepacia* kompleks izolatının grafik ve jel görüntüsü

Biyoanalizörden alınan bant ölçüm sonuçlarına göre 40 bç - 1404 bç büyüklüğünde bant sonuçlarına balgam kültüründen izole edilen 3 *B. cepacia* kompleks izolatının sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda grup F harfi ile isimlendirilmiştir. İzolatların AP-PCR gruplandırmasında 2 izolat I. grupta 1 izolat ise V. grupta değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.10. G grubu olarak adlandırılan *B. cepacia* kompleks izolatlarının bant büyüklüğü (bç) ölçüm sonuçları

Tepe sayısı	ulaştığı süre saniye	korelasyon bölgesi	bant bç	konsantrasyon ng/ul	molarite nmol/l	
1	41.85	5.04				
2	42.45	11.92				
3*	43.05	113.48	15	4.2	424.24	Lower Marker
4	45.45	9.57	28	2.5	137.95	
5	46.05	6.86	32	1.8	84.45	
6	83.00	290.85	404	56.7	212.61	
7	87.40	2.89	473	0.56	1.81	
8	90.20	12.27	526	2.4	6.89	
9	91.30	4.38	553	0.85	2.34	
10	91.85	5.00	567	0.97	2.60	
11	92.55	16.00	584	3.1	8.09	
12	93.65	45.39	612	8.8	21.90	
13	94.45	246.34	632	48.0	115.14	
14	96.90	5.30	693	1.0	2.26	
15	97.25	7.66	702	1.5	3.22	
16	98.05	8.39	734	1.6	3.38	
17	98.45	6.86	749	1.3	2.70	
18	98.85	6.84	765	1.3	2.64	
19	99.45	12.18	789	2.4	4.56	
20	100.30	7.57	822	1.5	2.72	
21	100.85	11.11	844	2.2	3.89	
22	102.10	8.57	929	1.7	2.74	

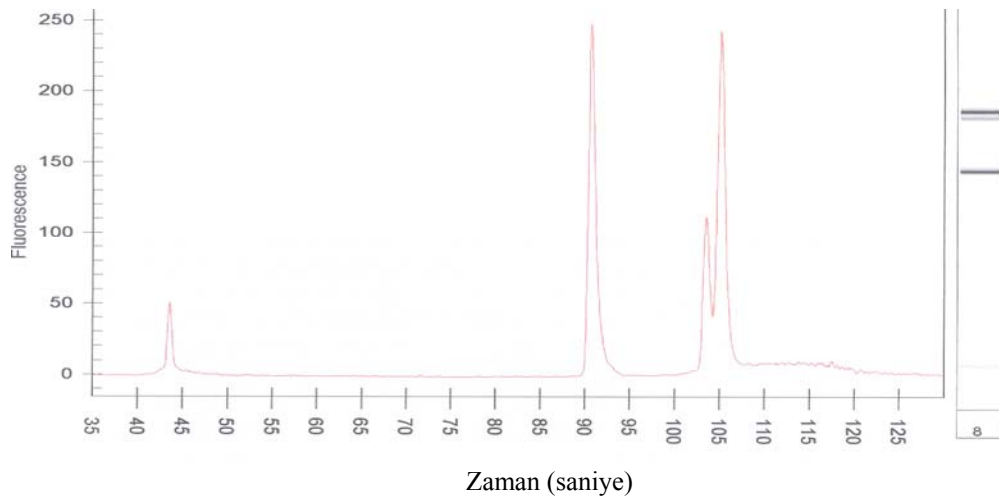


Şekil 3.19. 10 ve 15 nolu *B. cepacia* kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü

Biyoanalizörden alınan bant ölçüm sonuçlarına göre 28 bç - 929 bç büyüklüğünde bant sonuçlarına balgam ve aspirat kültürlerinden izole edilen 2 *B. cepacia* kompleks izolatının sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu grup G harfi ile isimlendirilmiştir. İzolatların AP-PCR gruplandırmasında balgam izolatı V. grupta, aspirat izolatı ise IV. grupta değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.11. H grubu olarak adlandırılan *B. cepacia* kompleks izolatlarının bant büyüklüğü (bç) ölçüm sonuçları

Tepe sayısı	ulaştığı süre	korelasyon bölgesi	bant	konsantrasyon	molarite	
	Saniye		bç	ng/ul	nmol/l	
1*	43.05	107.32	15	4.2	424.24	Lower Marker
2	44.45	8.22	22	3.1	213.24	
3	83.95	362.39	419	83.1	300.73	
4	93.15	5.84	599	1.3	3.38	
5	94.85	116.83	642	26.8	63.28	
6	96.00	337.28	670	77.4	174.89	
7	98.70	8.90	759	2.0	4.07	
8	99.20	5.36	779	1.2	2.39	
9	100.15	7.76	816	1.8	3.30	
10	101.00	5.56	850	1.3	2.27	
11	101.65	7.79	896	1.8	3.03	
12	102.40	6.36	950	1.5	2.34	
13	103.10	9.95	1000	2.3	3.50	
14	104.20	6.83	1162	1.7	2.17	
15	104.75	11.50	1243	2.9	3.51	
16	105.75	8.22	1390	2.2	2.36	
17*	106.50	7.68	1500	2.1	2.12	Upper Marker
18	107.35	5.47				
19	108.10	7.07				
20	108.95	2.53				
21	109.90	2.01				

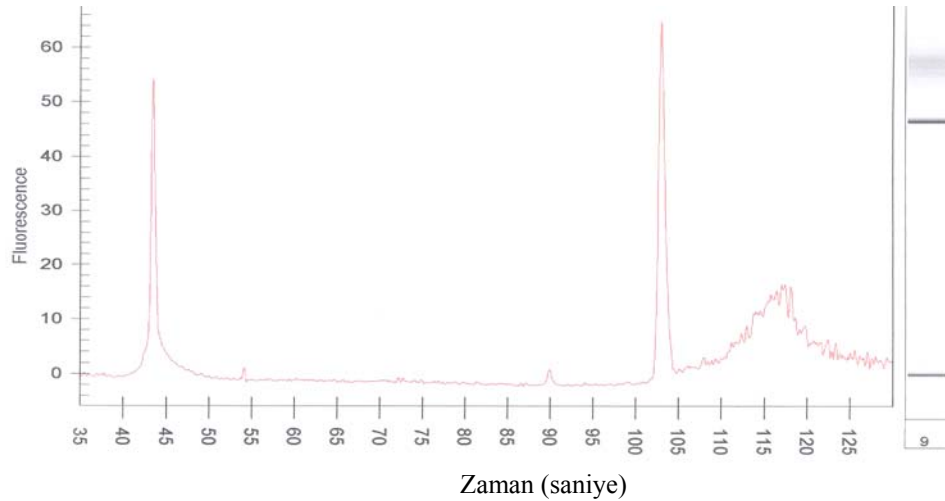


Şekil 3.20. 12 ve 23 nolu *B. cepacia* kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü

H grubunun üyeleri aspirat kültüründen PCR ile identifiye edilen *B. cepacia* kompleks izolatlarıdır. İzolatların biyoanalizörde meydana getirdiği bant büyüklüklerinin 22 bç – 1390 bç arasında değiştiği tespit edilmiştir. AP-PCR’de aspirat kültür izolatı *B. cepacia* kompleks I.grup üyesi, diğer *B. cepacia* kompleks izolatı ise IV. grup üyesi olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.12. I grubu olarak adlandırılan *B. cepacia* kompleks izolatlarının bant büyüklüğü (bç) ölçüm sonuçları

Tepe sayısı	ulaştığı süre saniye	korelasyon bölgesi	bant bç	konsantrasyon ng/ul	molarite nmol/l	
1*	43.05	129.22	15	4.2	424.24	Lower Marker
2	93.70	62.76	613	18.5	45.78	
3	100.05	2.20	812	0.65	1.21	
4	100.90	4.57	846	1.3	2.41	
5	102.40	10.23	950	3.0	4.86	
6	103.10	6.76	1000	2.0	3.06	
7	103.55	7.34	1066	2.2	3.18	
8	104.15	11.25	1154	3.5	4.63	
9	104.55	15.56	1213	5.0	6.20	
10	105.55	21.18	1360	7.1	7.91	
11*	106.50	5.97	1500	2.1	2.12	Upper Marker
12	106.95	3.94				
13	107.65	4.48				
14	108.20	1.47				



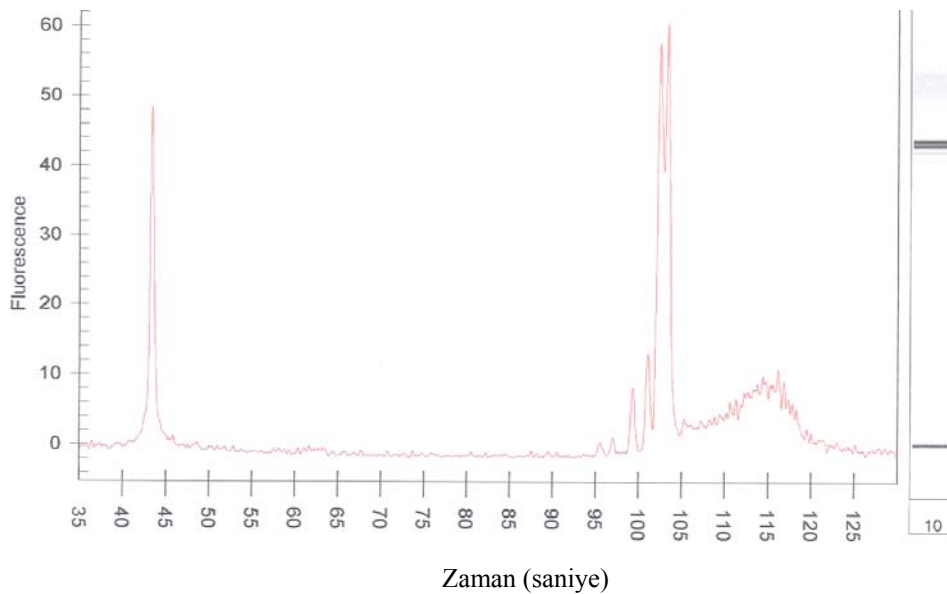
Şekil 3.21.17 ve 27 nolu *B. cepacia* kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü

Aspirat kültüründen PCR ile identifiye edilen *B. cepacia* kompleks izolatlarının biyoanalizörde meydana getirdiği bant büyüklüklerinin 613 bç – 1360 bç arasında

değiştirdiği tespit edilmiştir ve grup I harfi ile isimlendirilmiştir. AP-PCR’de aspirat kültür izolatu *B. cepacia* kompleks I.grup üyesi, diğer *B. cepacia* kompleks izolatu ise V. grup üyesi olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.13. J grubu olarak adlandırılan *B. cepacia* kompleks izolatlarının bant büyüklüğü (bp) ölçüm sonuçları

Tepe sayısı	ulaştığı süre saniye	korelasyon bölgesi	bant bp	konsantrasyon ng/ul	molarite nmol/l	
1*	43.05	91.20	15	4.2	424.24	Lower Marker
2	91.45	6.99	557	1.8	4.87	
3	93.05	11.68	597	3.0	7.59	
4	94.55	102.80	634	26.3	62.89	
5	96.60	3.53	685	0.90	2.00	
6	99.85	2.93	805	0.75	1.41	
7	100.40	2.90	826	0.74	1.36	
8	101.10	4.49	857	1.2	2.03	
9	101.50	6.81	886	1.7	2.99	
10	102.25	5.16	939	1.3	2.15	
11	102.95	8.14	989	2.1	3.23	
12	103.35	6.28	1037	1.6	2.41	
13	104.10	10.52	1147	2.9	3.77	
14	105.05	8.07	1287	2.3	2.70	
15	105.90	9.63	1412	2.8	3.06	
16*	106.50	6.88	1500	2.1	2.12	Upper Marker
17	107.05	4.53				

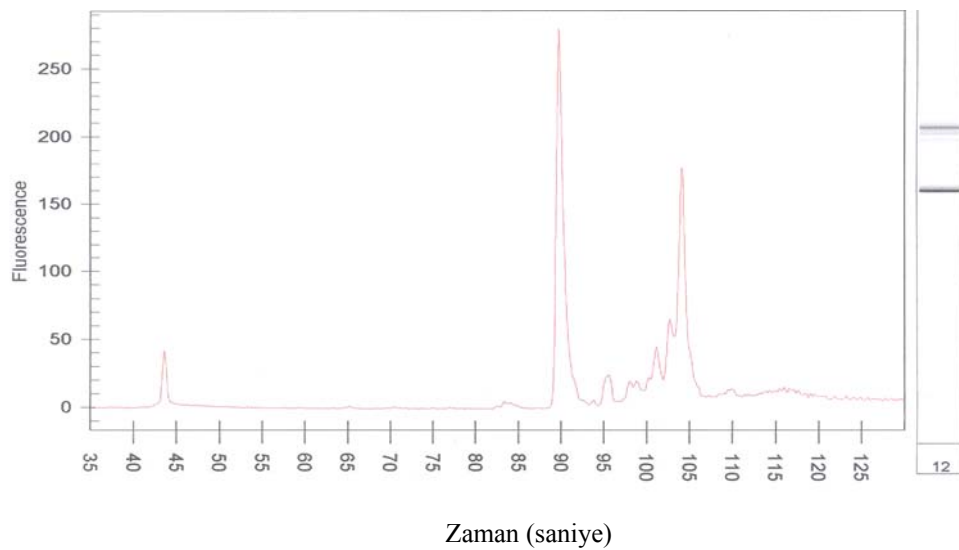


Şekil 3.22. 18 ve 25 nolu *B. cepacia* kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü

Yara kültüründen PCR ile identifiye edilen *B. cepacia* kompleks izolatlarının biyoanalizörde meydana getirdiği bant büyüklüklerinin 557 bç – 1412 bç arasında değiştiği tespit edilmiştir ve grup J harfi ile isimlendirilmiştir. AP-PCR’de yara izolatı *B. cepacia* kompleks II.grup üyesi, diğer *B. cepacia* kompleks izolatı ise V. grup üyesi olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.14. K grubu olarak adlandırılan *B. cepacia* kompleks izolatlarının bant büyüklüğü (bç) ölçüm sonuçları

Tepe sayısı	ulaştığı süre Saniye	korelasyon bölgesi	bant bç	konsantrasyon ng/ul	molarite nmol/l	
1*	43.05	70.93	15	4.2	424.24	Lower Marker
2	78.15	3.43	349	0.85	3.70	
3	83.90	373.67	418	92.1	333.76	
4	86.25	3.76	455	0.93	3.09	
5	88.45	11.68	489	2.9	8.91	
6	88.95	18.75	497	4.6	14.09	
7	91.30	20.74	553	5.1	13.99	
8	91.75	13.55	565	3.3	8.96	
9	92.85	20.79	592	5.1	13.11	
10	93.90	50.46	618	12.4	30.48	
11	95.30	54.91	653	13.5	31.40	
12	96.35	211.93	679	52.2	116.54	
13	97.45	31.80	710	7.8	16.72	
14	99.30	5.65	783	1.4	2.69	
15	100.80	7.81	842	1.9	3.46	
16	101.70	15.19	900	3.8	6.32	
17	103.90	4.41	1118	1.1	1.54	
18	104.50	3.75	1206	1.00	1.25	
19	105.25	5.55	1316	1.5	1.76	
20	106.10	3.83	1441	1.1	1.16	
21*	106.50	7.15	1500	2.1	2.12	Upper Marker
22	107.30	3.63				



Şekil 3.23. 24 ve 28 nolu *B. cepacia* kompleks izolatlarının grafik ve jel görüntüsü.

Yara kültüründen PCR ile identifiye edilen *B. cepacia* kompleks izolatlarının biyoanalizörde meydana getirdiği bant büyüklüklerinin 349 bç – 1441 bç arasında değiştiği tespit edilmiştir ve grup K harfi ile isimlendirilmiştir. AP-PCR’ de yara izolatı *B. cepacia* kompleks I.grup üyesi, diğer *B. cepacia* kompleks izolatı ise AP-PCR’ de VI. grup üyesi olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda AP-PCR’de tespit edilen bantların büyüklüklerinin ölçüm sonuçlarının kesin değerleri tespit edilemediğinden için bant büyüklüğü açısından gruplar arasında ve grup sayısında yanılmaların olabileceğinin belirtilmesinde yarar vardır. Buna karşılık biyoanalizör analizinde alınan sonuçlar bilgisayar ortamın üç değişik şekilde tespit edilmiştir. Biyoanalizör sonuçları bantların sayısal büyüklüğü, jel görüntüsü ve grafiksel gösterim olarak belirlenmiştir. 28 *B. cepacia* kompleks izolatının grup dağılımı üç farklı yolla elde edilen değerlendirme sonucunda daha güvenilir bir şekilde belirlenmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

Moleküler yöntemlerle değerlendirilen 93 *Pseudomonas spp.* suşundan tespit edilen 24 *B. cepacia* kompleks izolatının anlamlılığı istatistiksel olarak TAD programı içerisinde Ki kare testi ile p değeri hesaplanmıştır (p değerinin <0.05 bulunduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir). Çalışmada *Pseudomonas spp.* ve *B. cepacia* kompleks grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ortaya çıkmıştır. Alınan bu sonuç klinik açıdan önem taşımaktadır.

Çizelge 3.15. Çeşitli hasta kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas spp.* ve *B. cepacia* kompleks izolatlarının dağılımı

Klinik örnekler	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>B. cepacia</i> kompleks	Toplam	p
Kan ¹	22	5	27	0.27
Yara ²	11	6	17	
İdrar ²	11	1	12	
Aspirat ²	14	5	19	
Balgam ²	9	4	13	
Vajen ²	0	2	2	
Göz ²	0	1	1	
Boğaz ²	2	0	2	
İnvaziv ¹	22 (%31,88)	5 (%20,88)	27 (%29,03)	0.55
Noninvaziv ²	47 (%68,11)	19 (%79,16)	66 (%70,96)	
Toplam	69	24	93	

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda kullanılan moleküler tekniklerde meydana gelen hızlı ilerlemeler sayesinde mikroorganizmaların DNA analizlerinin yapılabilmesi, klinik mikrobiyoloji çalışmalarında geleneksel kültür yöntemlerine karşı alternatif olarak bazı moleküler tekniklerin kullanımını gündeme getirmiştir. *P. aeruginosa* ve *B. cepacia* kompleks DNA analiz çalışmalarında son dönemlerde yaygın olarak kullanılan ve çok hassas moleküler bir yöntem olduğu belirlenen PCR kullanılmaktadır. Bu tür moleküler tekniklerin avantajlarının başında PCR'ın bir kez çalışmasında birden çok örneğin bir arada test edilmesi ile araştırmaya kazandırdığı hız, test sonuçlarının bilgisayar ortamında alınması ile değerlendirmelerde ortak birliğin sağlanması ve testlerin istenildiği anda tekrarlanabilir olması çalışmaya güvenilirlik kazandırmaktadır (96, 97).

Hastane enfeksiyonları arasında adı geçen ve özellikle kistik fibroz hastalarında sıklıkla gözlenen *B. cepacia* kompleksde yer alan organizmaların izolasyonu ve identifikasyonu tiplendirme çalışmaları açısından büyük öneme sahiptir.

Son zamanlarda PCR tabanlı tiplendirme metotları özellikle kistik fibroz hastalarından izole edilen *B. cepacia* kompleks identifikasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu metotların kullanılması kısa zamanda birçok izolatin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (95).

PCR tekniğinde kullanılan genetik materyal çok az miktarda, bile olsa çoğaltılabilir ve homojen materyal hale getirilerek kolaylıkla tanımlanabilir. PCR tekniği ile laboratuvar tanısına büyük bir hız ve kesinlik kazandırılmıştır. Ayrıca radyoaktivite kullanımı birçok durumda gereksiz hale gelmiştir. Bu şekilde PCR tekniği mikrobiyolojik çalışmaların vazgeçilmezi olmuştur (94).

PCR tabanlı identifikasyon sistemlerinin gelişmesi ve geniş kullanım alanlarına sahip olması sonucunda *B. cepacia* kompleks ve genotiplerine bağlı olan insan

enfeksiyonlarının epidemiyolojisi olumlu yönde etkilenmiştir (98).

PCR tekniği, geleneksel kültür yöntemi ile karşılaştırıldığında; kültür yöntemi 10^3 bakteriye kadar hassaslık gösterirken, PCR tekniğinin 10 bakteriye kadar hassas olduğu tespit edilmiştir (76). Araştırmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 4 *B. cepacia* kompleks izolatlarının adlandırılmasında kültür yöntemi, API ve PCR tekniklerinin bir arada kullanılmıştır. Çalışmada üç yöntemin bir arada kullanılması, yöntemlerin karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır.

Bazı araştırmacılar tarafından bakteriyolojik kültür yöntemi kullanmadan PCR kullanılarak kistik fibroz hastalarının direkt balgam örneklerinden *B. cepacia* kompleks identifikasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar bu tekniğin ortamdaki az sayıda bulunan bakterileri belirlediğini ve geleneksel kültür yöntemlerine oranla daha hızlı, basit ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir (94). Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas* spp suşları arasında *B. cepacia* kompleks varlığını PCR ile tespit edilmiştir. Bunun sonucunda alışılmış mikrobiyolojik yöntemlerle *Pseudomonas* tanısı konulan 93 suşun 24'ü *B. cepacia* kompleks için spesifik olan 770bç büyüklüğünde 16S rRNA genine sahip olduğu U.V. ışığı altında belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan PCR tekniği, *Pseudomonas* spp. suşları arasında *B. cepacia* kompleks izolatlarını ayırt edebilmesi ve geleneksel yöntem ile ticari teknik olan API20 NE identifikasyonu sonucunda *B. cepacia* kompleks olarak adlandırılan örneklerin doğrulanması bakımından güvenilir olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, çok az miktardaki örneklerle bile çalışmaya olanak sağlaması, hızlı ve hassas olması özellikleri ile geleneksel kültür yöntemine karşı bir alternatif olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Araştırmada çeşitli kliniklerden alınan 89 hastaya ait 93 *Pseudomonas* spp. identifikasyonu PCR tekniği ile çalışıldığında izolatların 24 izolatta *B. cepacia* kompleksine ait gen bölgesini taşıdığı tespit edilmiştir. 93 *Pseudomonas* spp. arasında *B. cepacia* kompleks dağılımlarını incelendiğinde kan kültürlerinden *Pseudomonas* spp. olarak adlandırılan 27 izolattan 5'i (%18.52) *B. cepacia* kompleks, yara kültürlerinden izole edilen 17 *Pseudomonas* spp. izolatın 6'sı (%35.3) *B. cepacia* kompleks, aspirat kültür örneklerinden izole edilen 19 *Pseudomonas* spp. izolatın 5'i (%26.32)

B. cepacia kompleks, 13 balgam kültür izolatının 4'ü (%30.77) ve 11 idrar kültür izolatının 1'i (%8,34) *B. cepacia* kompleks izolatı olarak tespit edilmiştir. Genel olarak sonuçları değerlendirildiğinde PCR reaksiyonu ile 93 *Pseudomonas spp.* izolatının içerisinde 24 izolatta *B. cepacia* kompleksine ait 770bç'lik ürün tespit edilmiştir ki bu oran %25,81'e karşılık gelmektedir. . Moleküler çalışma sonuçları doğrultusunda çeşitli kültürlerden izole edilen nonfermenterlerin yaklaşık olarak dörtte birinin tür adının yanlış adlandırıldığı ve nonfermenterlerin adlandırılmasında kültür yöntemlerinin tek başına yeterli olmadığı söylenebilir. Özellikle solunum yollarında ciddi enfeksiyonlara yol açan, kistik fibroz hastalarında akciğer patojeni olarak bulunan ve aynı zamanda hastane patojenleri arasında ilk dörtte yer alan *B. cepacia* kompleks için azımsanamayacak bir önemde karşımıza çıkmaktadır. Böylelikle araştırmalarda büyük yer kaplayan epidemiyolojik çalışmalar açısından identifikasyonda yaşanan zorlukların önüne geçilmesinin önemliliği tespit edilmiştir. Nonfermenter bakterilerin biyokimyasal analizlerinin daha duyarlı bir şekilde yapılması ve günümüzde birçok testin yerini almış olan moleküler yöntemlerle değerlendirilmesi ve desteklenmesinin gerekliliği belirlenmiştir.

McDowell ve arkadaşları 100 balgam örneğinden kültür yöntemi ile 19 *B. cepacia* kompleksi izole etmişlerdir. Bu örnekler için PCR kullandıkları zaman 17 *B. cepacia* kompleks izolatını identifiye etmişlerdir. Çalışma sonuçları doğrultusunda kültür izolasyonlarını PCR identifikasyonun takip etmesi gerektiğini bildirmişlerdir (61).

Çalışmamızda kültür yöntemi ile *Pseudomonas spp.* adlandırması yapılan 13 balgam örneğini PCR ile test ettiğimiz de 4 *B. cepacia* kompleks izolatı tespit edilmiştir.

Araştırmacılar moleküler düzeyde yapılan analizlerin bakterilerin identifikasyonu için daha güvenilir sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir (99).

Yine çeşitli araştırmacılar PCR tabanlı moleküler analizleri *B. cepacia* kompleks suşlarının identifikasyonu için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına önermişlerdir

(59). Bu nedenle çalışmamızda PCR tabanlı analizler *B. cepacia* kompleks identifikasyonu için avantajlı olduğu tespit edilmiştir.

PCR metotları özellikle kistik fibroz klinik tanı laboratuvarları için identifikasyonda, hızlı, güvenilir ve istenildiği anda tekrarlanabilen testler olarak tanımlanmıştır (59). Bu sebeple çalışmamızdaki suşların moleküler identifikasyon sonuçları araştırmacıların PCR sonuçlarının güvenilirliğine verdiği destekle bir kez daha doğrulanmaktadır. Kistik fibroz hastalarından alınan örneklerde *B. cepacia* kompleks ve diğer *Burkholderia* türlerinin identifikasyonu için PCR tekniği kullanılmıştır (100, 101).

Patojenitesi önemli *B. mallei* ve *B. pseudomallei*'nin identifikasyonunda da araştırmacılar tarafından PCR'ın kullanılması tavsiye edilmektedir (102).

Klinikte *B. cepacia* kompleks identifikasyonu için PCR-RFLP analizleri altın standartlar olarak bildirilmektedir (97).

Araştırmada 93 *Pseudomonas spp.* suşu içerisinde PC480-PC1250 oligonükleotid primerleri ile 24 *B. cepacia* kompleks suşunun identifikasyonu yapılmıştır. Kullanılan PC480-PC1250 sentetik oligonükleotid primerleri *B. cepacia* kompleks 16S rRNA geninin 770bp'lik bölgesini çoğaltma özelliğine sahiptir (93).

O'Callaghan ve arkadaşları *B. cepacia* kompleks üyelerinin identifikasyonunda spesifik oligonükleotid primerlerin kullanıldığı PCR çalışmalarını önermektedirler (92).

Çalışmada 28 *B. cepacia* kompleks izolatının doğrulama analizi sırasında *Taq I*, *Tsp 509I* ve *Rsa I* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar %2 agoroz jelde görüntülenmiştir (Resim 3.5, 3.6, 3.7, 3.8).

Bazı araştırmacılar çalışmada kullandığımız restriksiyon endonükleaz enzimlerinden farklı enzimleri çalışmaları için tercih ederek kullanmışlardır (100, 101).

Araştırmacılar epidemiyolojik çalışmalarda PCR ürünlerinin çeşitli restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim noktalarının belirlenmesinin önem ve gerekliliği, bu çalışmalar sonucunda bakteri örneklerinde meydana gelen mutasyonların tespitinin mümkün olduğunu bildirmiştir (21). Araştırmada kullandığımız *Taq I* restriksiyon endonükleazı, 28 *B. cepacia* kompleks izolatının 17'sinde 473 ve 300 bp'lik ürünleri vermiştir. *Tsp 509I* restriksiyon endonükleazı ile, 341 ve 204 bp'lik ürünler 23 *B. cepacia* kompleks izolatında gözlenmiştir. *Rsa I* restriksiyon endonükleazı ile yapılan doğrulama analizinde 365, 150 ve 100 bp'lik ürünler 28 *B. cepacia* kompleks izolatının hepsinde tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar doğrultusunda bazı *B. cepacia* kompleks izolatlarında istenilen bant büyüklüklerinin tespit edilememesi örneklerin bu bölgelerinde bir mutasyon olabileceğini düşündürmektedir.

Segonds ve arkadaşları kistik fibrozlu hastalardan izole ettikleri *Burkholderia* türleri arasında temsil edilen grupları ortaya çıkarmak amacıyla RFLP analizini yapmışlardır. Araştırmalarında *Alu I*, *Cfo I*, *Dde I*, *Msp I*, *Nci I* ve *BssK I* restriksiyon endonükleaz enzimlerini kullanmışlardır. Bu sonuçlar %3'lük agaroz jelde görüntülenmiştir (101).

Van Pelt ve arkadaşları Alman kistik fibroz hastalarının balgam örneklerinden izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirdikleri *Burkholderia* izolatlarının 16S rDNA geninin PCR çoğaltma ürünlerini *Alu I*, *Cfo I*, *Msp I* ve *Dde I* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile doğrulamış ve sonuçları %1'lik agaroz jelde görüntülemişlerdir (97). Bu çalışmada izlenilen metotlar, araştırmada kullandığımız metotlar ile paralellik göstermektedir.

Kistik fibrozis hastalarının balgam ve vajen örneklerinden identifiye ettikleri 11 *B. cepacia* kompleks izolatının mikrobiyolojik karakterini araştırdıkları çalışmalarda PCR ürünlerini *EcoR I* ve *Pvu II* restriksiyon endonükleaz enzimi ile doğrulamışlar ve %0,8'lik agaroz jelde görüntülemişlerdir (100).

Hales ve arkadaşları *B. cepacia* kompleks izolatlarının PCR örneklerini *Hae III* ve *Msp I* restriksiyon endonükleaz enzimlerini kullanarak oluşturdukları bantları görüntülenmişlerdir (103). Araştırmacılar tarafından kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimlerinin çeşitlilik gösterdiği çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. Araştırmada 16S rRNA (770 bp) geninde kesim yapan *Taq I*, *Rsa I* ve *Tsp 509I* restriksiyon endonükleaz enzimleri seçilerek kullanılmıştır.

Literatürde birçok bakteri türü için 16S rRNA sekansı ile enzimlerin ayırt edilerek seçilmesi tavsiye edilmektedir (104). Özellikle bu metot *Pseudomonas* türlerinin birbirinden ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (16).

Son yıllarda klinik laboratuvarlarda 16S rRNA geninin sekans analizi filogenetik akrabalık derecelerinin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Bu amaçla bakterilerin filogenetik çalışmaları için tasarlanan cihazların laboratuvarlarda sık kullanıldığı bildirilmiştir (105).

Literatürde kistik fibrozlu hastaların balgam örneklerinden tanımlanmış *B. multivorans* ve *B. cepacia* kompleks sekans analizinde PCR ürünlerinin QIAquick PCR kiti ile (Qiagen, UK) pürifiye edildiği bildirilmiştir. Pürifiye PCR ürünleri ALF Express II (Amersham- Pharmacia, Buckinghamshire, England) sekans sisteminde değerlendirilmiştir (94).

Araştırmada elde edilen PCR ürünleri Wizard PCR pürifikasyon kiti ile temizlenmiştir. Daha sonra pürifiye PCR ürünleri çalışmamızda DNA dizi analizi için kullanılmıştır.

Araştırmacılar çalışmalarında 16S rRNA bölgesinin sekans çalışmasını yapmak için Genetics Computer Group PILE UU bilgisayar programını kullanarak *Burkholderia* türleri arasındaki heterojenliği tespit etmişlerdir (106).

Araştırmada otomatize floresanlı (CEQ 2000 XL, Beckman Coulter, ABD) sekans cihazı kullanılmış ve örneklerin nükleotid dizisi belirlenmiştir. Kontrol dizisi ile sekans sonuçlarımızın uygunluk gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmada 28 *B. cepacia* kompleks izolatının moleküler bantlarını belirlemek için AP-PCR tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla AP1-5'-GTT GCG ATC-3' sentetik oligonükleotid primeri kullanılmıştır. AP-PCR sonucunu değerlendirebilmek için poliakrilamid jel elektroforezinden yararlanılmıştır.

Çeşitli araştırmacılar tarafından *P. aeruginosa* izolatlarının AP-PCR ile 11 farklı bant yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Literatürde epidemiyolojik tiplendirme için AP-PCR tekniğinin kullanışlı olduğu rapor edilmiştir (107, 108). Araştırmada AP-PCR ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforezinde değerlendirilmesi sonucunda 28 *B. cepacia* kompleks izolatının 6 farklı moleküler bant yapısına ayrıldığı tespit edilmiştir (çizelge 3.2). Çalışmada kullanılan AP-PCR tekniğinin *B. cepacia* kompleks izolatlarının moleküler tanısında ilk aşama olarak kullanılmasını önerilebilir.

Ayrıca çalışmada oldukça yeni bir teknik olan ve daha önce *Burkholderia* türlerine uygulandığı bildirilmeyen DNA analizi kullanılmıştır. Bu çalışma için AP-PCR ürünleri biyoanalizörde değerlendirmeye alınmıştır. Çalışma sonucunda biyoanalizörde AP-PCR ürünlerinin 11 moleküler bant grubuna ayrıldığı tespit edilmiştir (çizelge 3.2). Bu moleküler bantların büyüklükleri sayısal değerlerle ifade edilmiştir. Ayrıca bu sayısal değerlere ilave olarak sonuçların grafik ve jel görüntüsü alınmıştır. Buna karşılık AP-PCR sonuçları sadece poliakrilamid jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre moleküler bantların biyoanalizörde değerlendirilmesi güvenilir, kolay ve pratik olarak belirtilmiştir. Çalışma sonuçları doğrultusunda, epidemiyolojik araştırmalar için geniş donanımlı moleküler genetik laboratuvarlarında biyoanalizör cihazının kullanılması tavsiye edilebilir.

Pseudomonas ailesi içerisinde çıkarılan *B. cepacia* kompleks identifikasyonunu moleküler yöntemlerle incelediğimiz çalışma sonuçlarına göre;

- 1- Hastaların kan, yara ve göz örneklerinden biyokimyasal yöntemlerle ve API 20NE ile 4 *B. cepacia* kompleks suşu izole ve tanımlanmıştır. Biyokimyasal ve ticari testlerin birbirini desteklediği tespit edilmiştir.
- 2- 89 hastaya ait 93 *Pseudomonas spp.* suşu ile birlikte 4 *B. cepacia* kompleks suşunun DNA izolasyonları fenol-kloroform yöntemi ile yapılmıştır. Suşlardan DNA izolasyonu bu yöntemle %100 başarı sağlanarak elde edilmiştir.
- 3- *B. cepacia* kompleks olarak tanımlanılan suşların PCR tabanlı tanımlama sisteminde spesifik oligonükleotid primer kullanılarak test edildiğinde 770 bp'lık 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltıldığı gözlemlenmiştir. Geleneksel kültür yöntemi, ticari test ve moleküler PCR tekniğinin *B. cepacia* kompleks tanımlamasında birbirine uygunluk gösterdikleri tespit edilmiştir.
- 4- 93 *Pseudomonas spp.* suşu içerisinde, türe özgü spesifik oligonükleotid primerleri ile PCR'da *B. cepacia* kompleks varlığı araştırıldığında 24 izolatta 16S rRNA bölgesine ait 770 bp'lık bant gözlemlenmiştir. Alınan bu sonuçlara göre PCR yöntemini geleneksel kültür yöntemi karşılaştırıldığında mikroorganizmaların tanımlamasında PCR yönteminin daha hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu belirlenmiştir.
- 5- 16S rRNA gen bölgesinde restriksiyon endonükleaz enzimleri ile dizi üzerinde bulunması gereken kesim noktalarını belirlemek amacıyla *Taq I*, *Rsa I* ve *Tsp 509I* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştır. Kesim noktaları ortadan kalkan örneklerde mutasyon olabileceği belirtilmiştir. Bu durumun araştırılması amacıyla tüm örneklerin bir ileri aşama olan DNA dizi analizine alınması gerekmektedir. Çalışmada maddi imkanlardan dolayı restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim noktası ile aynı yerden kesilen 4 örneğe DNA dizi analizi uygulanabildi. Elde edilen baz dizisini *B. cepacia* kompleks baz dizisi (ulaşım no:AY207313) ile karşılaştırıldığında baz dizilerinin birbirinin aynı olduğu tespit edilmiştir.
- 6- Çalışmada moleküler bant yapılarını belirlemek amacıyla 28 *B. cepacia* kompleks izolatlarına AP-PCR tekniği uygulanmıştır. AP-PCR sonucunda birbirine benzeyen ve benzemeyen tüm örnekleri değerlendirebilme ve fazla sayıda örneği yan yana görme imkanı sağlayan poliakrilamid jel tekniği kullanılmıştır. Bu

Çalışmanın sonucunda 6 farklı bant yapısı gözlenmiştir. Bant karakteristiğinin tespitinde AP-PCR tekniğinin oldukça kullanışlı, hızlı ve aydınlatıcı bir teknik olduğu gözlenmiştir.

- 7- Bu çalışmada oldukça yeni bir teknik olan ve daha önce *Burkholderia* türlerine uygulandığı bildirilmeyen DNA biyoanalizi kullanılmıştır. DNA biyoanalizinde AP-PCR ürünleri biyoanalizörde değerdendirmeye alınmıştır. Çalışma sonucunda AP-PCR’de elde edilen sonuçlara göre daha fazla sayıda bant yapısı tespit edilmiştir. Tüm zayıf ve güçlü bantlar büyüklükleriyle beraber belirlenmiştir.
- 8- Biyoanalizörde az miktarda örnekle çabuk ve kolay sonuç alınabilmektedir. Alınan sonuçların uzun süre saklanması ve istenildiğı anda grafiksel, sayısal ve jel görüntüsü olarak alınabilmesinin bu tekniğe üstünlük sağladığı gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Burkholder, W.H., "Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs" , *Phytopathology*, 40:115-117 (1950).
2. Skerman, V.B.D., McGovan, V., and Sneath, P. A. H., "Apptoved list of bacterial names" , *Int. J. Syst. Bacteriol.*,30:225-420 (1980).
3. Palleroni, N. J., and Holmes, B., "*Pseudomonas cepacia*, sp. nov., nom. Rev" , *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 31:479-481 (1981).
4. Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopoulo, R., and Doudoroff, M., "Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*" , *Int. J. Syst. Bacreriol.*, 23: 333-339 (1973).
5. LiPuma, J.J., "Update on the *B. cepacia* complex" , *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 11(6):528-533 (2005).
6. Gilligan PH., "*Pseudomonas* and *Burkholderia*" , Manual of Clinical Microbiology Murray, Baren, Bfaller Tennover and Yolken , *ASM Press*, Washington DC , 509-519 (1995).
7. Pollack M., "*Pseudomonas aeruginosa*" , Principles and Practice of Infectious Diseases Mandell Douglas and Bennett, *Churchill Livingston Inc*, New York 1673-91 (1990).
8. Hall GS., "Nonfermenting gram negative bacilli and Micellaneous Gram negative Rods" , Textbook of Diagnostic Microbiology, Mahon and Manuselis Jr , *WB Saunders Company*, Philadelphia , 513-38 (1995).
9. Bert F, Lambert-Zechovsky N., "Comparative distribution of resistance patterns and serotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care units and otherswards" , *J. Antimicrob Chemother.*, 37:809-813 (1996).
10. Poh, C.L., Yeo, C.C., "Recent advances in typing of *Pseudomonas aeruginosa*" , *J. Hosp. Infect.*, 24:175-181 (1993).
11. Pujana I., Gallena L., Canduela M.J., Cisterna R., "Specific and rapid identification of multiple-antibiotic resistant. *Pseudomonas aeruginosa* isolated in an intensive care unit" , *Diagnostic Mic. And Infectious Disease.*, 36:65-68 (2000).
12. Gilligan, P.H., "Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis" , *Clin. Microbiol. Rev.*, 4:35-51 (1989).

13. Kersulyte D., Struelens M. J., Deplano A., Berg D.E., “Comparison of Arbitrarily Primed PCR and Macrorestriction (PFGE) Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from Cystic Fibrosis Patients” , **J. Clin. Microbiol.**, 2216-2219 (1995).
14. Tuncer S, Akova M., “*Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonları” , **Flora**, 1: 61-5 (1997).
15. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, H., Hotta, I., Hashimoto, Y., Ezak, T., and Arakawa, M., “Proposal of *Burkholderia* gen. Nov; and transfer of seven species of the *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb, nov” , **Microbiol. Immunol.**, 36:1251-1275 (1992).
16. Achonak, W., R. Christen, M., Bakarar, M., Martel, H. and Henlin T., “*Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique” , **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 49:787-794 (1999).
17. Brett, P.J., DeShazer,D., and Woods, D.E., “*Burkholderia thailandensis* sp. nov. A *Burkholderia pseudomallei* like species” , **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 48:317-320 (1998).
18. Coenye, T., Falsen, E., Hoste, B., Ohlen, M., Goris, J., Govan, J. R.W., Gillis, M., and Vandamme, P., “Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. Nov” , **Int.J.Syst. Evol. Microbiol.**, 50:405-413(2000).
19. Coenye, T., Holmes, B., Kerster, K., Govan, J. R.W., and Vandamme, P., “*Burkholderia cocovenenans* (van Damme et. All. 1960) Gillis et all. 1995 and *Burkholderia vandii* Urakami et. All. 1994 are junior subjective synonyms of *Burkholderia gladioli* (severini 1913) Yabuuchi et. All. 1993 and *Burkholderia plantarum*, (Azegami et. All. 1987) Urakami et. All. 1994 respectively” , **Int J. Syst. Bacteriol.**, 49:37-42 (1999).
20. Butler, S.L., Doherty, C. J. J., Hughes, E., Nelson, J. W., and Govan, J.R.W., “*Burkholderia cepacia* and cystic fibrosis: do natural environments present a potential hazard” , **J. Clin. Microbiol.**, 33:1001-1004 (1995).
21. Bevivino, A., S. Tabacchioni, L. Chiarini, M. V. Carusi, M. Del Gallo, and P. Visca., “Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*” , **Microbiology**, 140:1069-1077 (1994).
22. Gillis, M., Van Van, T., Bardin, R., Goor, M., Hebbar, P., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T., and Fernandez, M. P., “Polyhasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and oroposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N2-fixing isolates from rice in Vietnam” , **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 45:274-289 (1995).

23. Kiska, D. L., Kerr, A., Jones, M.C., Caracciolo, J.A., Eskridge, B., Jordan, M., Miller, S., Hughes, D., King, N., and Gilligan, P., "Accuracy of four commercial system for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative, nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis" , *J. Clin. Microbiol.*, 34:886-891 (1996).
24. Larsen, G. Y., Stull, T. L., and Burns, J.L., "Marked phenotyping variability in *Pseudomonas cepacia* isolated from a patient with cystic fibrosis" , *J. Clin. Microbiol.*, 31:788-792 (1993).
25. Left, L.G., Kernan, R. M., McArthur, J. V., and Shimkets, L.J., "Identification of aquatic *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* by hybridization with species-specific rRNA gene probes" , *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1634-1636 (1995).
26. Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K., Govan, J. R. W., "Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov." , *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47:1188-1200 (1997).
27. Vandamme, P., Mahenthiralingam, E., Holmes, B., Coenye, T., Hoste, T. B., De Vos, P., Henry, D., and Speert, D. P., "Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV)" , *J. Clin. Microbiol.*, 38:1042-1047 (2000).
28. Coenye, T., LiPuma, J. J., Henry, D., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gillis, M., Speert, D. P., and Vandamme, P., "*Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients" , *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 51:271-279 (2001).
29. Mahenthiralingam, E., Biscof, J., Byrne, S. K., Radomski, C., Davies, J.E., Av-Gay, Y., and Vandamme, P., "DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomvars I and II" , *J. Clin. Microbiol.*, 38:3165-3173 (2000).
30. Coenye, T., Mahenthiralingam, E. D., Henry, J., LiPuma, J., Laenens, S., Gillis, M., Speert, D. P., and Vandamme, P., "*Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates" , *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51:1481- 1490 (2001).
31. Coenye, T., Schouls, L. M., Govan, J. R. W., Kersters, K., and Vandamme, P., "Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting" , *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49:1657-1666 (1999).
32. Li F. K., Chan, K. W., Chan, T. M., Lai, K. N., "*Burkholderia* urinary tract infection after renal transportation" , *Transpl. Infect. Dis.*, 5(1):59-61 (2000).

33. Quinn, JP., "Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens" , *Clin. Infect. Dis.*, 27(1): 117-124 (1998).
34. Govan, J. R. W., Hughes, J. E., and Vandamme,P., "*Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues" , *J. Med. Microbiol.*, 45:395-407 (1996).
35. LiPuma, J. J., "*Burkholderia cepacia* epidemiology and pathogenesis: implications for infection control" , *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 4:337-441 (1998).
36. Isles A, Maclusky I, Corey M., "*Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem" , *J. Pediatr.*, 104:206-210 (1984).
37. Govan JRW, Deretic V., "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*", *Microbiol Rev.*, 60:539-574 (1996).
38. LiPuma JJ., "*Burkholderia cepacia*: management issues and new insights" , *Clin. Chest. Med.*, 19:473-486 (1998).
39. Ahlin, A., De Boer, M., Roos, D., Leusen, J., Smith, C. I., Sundin, U., Rabbani, H., Palmblad, J., and Elinder, G., "Prevalence, genetics and clinical presentation of chronic granulomatous disease in sweden" , *Acta Paediatr.*, 84:1386-1394 (1995).
40. Lacy, D. E., Spencer, D. A., Goldstein, A., Weller, P. H., and Darbyshire, P., "Chonic granulomatous disease presenting in childhood with *Pseudomonas cepacia* septicaemia" , *J. Infect.*, 27:301-304 (1993).
41. Mardiney, M., Jackson, S. H., Spratt, S. K., Li, F., Holland, S. M., and Malech, H. L., "Enhanced host defense after gene transfer in the murine p47phox-deficient model of chronic granulomatous disease" , *Blood*, 89:2268-2275 (1997).
42. Speert, D. P., Bond, M., Woodmann, R.C., and Curnutte, J.T., "Infection with *Pseudomonas cepacia* in chronic granulomatous disease: role of nonoxidative killing by neutrophils in host defense" , *J. Infect. Dis.*, 170:1524-1531 (1994).
43. Hobson, R., Gould, I., and Govan, J. R. W., "*Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* as a cause of brain abscesses secondary to chronic suppurative otitis media" , *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 14:908-911 (1995).
44. Govan, J. R. W., Balandreau, J., and Vandamme, P., "*Burkholderia cepacia*-friend and foe" , *ASM News*, 66:124-125 (2000).

45. LiPuma, J. J., Dasen, S. E., Nielson, D. W., Stern, R. C., and Stull, T. L., "Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis" , ***Lancet***, 336:1094-1096 (1990).
46. Cunha, M. V., Leitaó J. H., Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Lito, L., Barreto, C., Salgado, M. J., Sa-Correia, I., "Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from Portuguese cystic fibrosis center a 7-year study" , ***J. Clin. Microbiol.***, 41:4113-4120 (2003).
47. Magalhaes, M., Doherty, C., Govan, J. R. W., Vandamme, P., "Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients" , ***J. Hosp. Infect.***, 54:120-123 (2003).
48. Kaitwatcharachai, C., Silpapojakul, K., Jitsurong, S., and Kalnauwakul, S., "An outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in hemodialysis patients: an epidemiologic and molecular study" , ***Am. J. Kidney Dis.***, 36:199-204 (2000).
49. Moore, J. E., Crowe, M., Shaw, A., McCaughan, J., Redmond, A. O., Elbom, J. S., "Antibiotic resistance in *Burkholderia cepacia* at two regional cystic fibrosis centres in Northern Ireland: Is there a need for synergy testing" , ***J. Antimicrob Chemother.***, 48:319-321 (2001).
50. Manna, G., Ugolotti, E., Belli, M. L., Fenu, M. L., Romano, L., Crucioni, M., "Use of the E test to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia* complex from patients with cystic fibrosis" , ***Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.***, 22:28-34(2003).
51. Burdge, D. R., Noble, M.A., Campbell, M.E., Krell, V.L., and Speert, D. P., "Xanthomonas maltophilia misidentified as *Pseudomonas cepacia* in cultures of sputum from patients with cystic fibrosis: a diagnostic pitfall with major clinical implications" , ***Clin. Infect. Dis.***, 20:445-448 (1994).
52. LiPuma, J.L., Marks-Austin, K. A., Holsclaw, D. S., Winnie, G. B., P. Gilligan, H. and Stull, T. L., "Inapparent transmission of *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* among patients with cystic fibrosis" , ***Pediatr. Infect. Dis. J.***, 13:716-719 (1994).
53. Tablan, O. C., Carson, I. A., Cusick, L. B., Bland, L.A., W. J. and Martone, W., Jarvis, R., "Laboratory proficiency test results on use of selective media for isolating *Pseudomonas cepacia* from simulated sputum specimens of patients with cystic fibrosis" , ***J. Clin. Microbiol.***, 25:485-487 (1987).
54. Gilligan P.H, Gage P.A, Bradshaw L.M., Schidlow D.V., DeCiccio B.T., "Isolation medium for the recovery of *Pseudomonas cepacia* from respiratory secretion of patients with cystic fibrosis" , ***J. Clin Microbiol.***, 22:5-8 (1985).

55. Coenye T., Vandamme P., Govan J.R.W., LiPuma J.J., "Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex" , **J. Clin Microbiol.**, 39: 3427-3436 (2001).
56. Whitby, W.P., Carter, B. K., Hatter, L. K., LiPuma, J.J., Stull, L. T., "Identification of members of the *Burkholderia cepacia* complex by species-specific PCR" , **J. Clin. Microbiol.**, 38:2962-2965 (2000).
57. Lagatolla, C., Skerlavaj, S., Dolzani, L., Tonin, A. E., Bragadin, M. C., Basco, M., Rizzo, R., Giglio, L., Cescutti, P., "Microbiological characterisation of *Burkholderia cepacia* isolates from cystic fibrosis patients investigation of the exopolysaccharides produced" , **FEMS Microbiol. Letters.**, 209:99-106 (2002).
58. Henry, D. A., Campbell, M. E., LiPuma, J. J., and Speert, D. P., "Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with Cystic fibrosis and use of a simple new selective medium" , **J. Clin. Microbiol.**, 35:614-619 (1997).
59. Ryley, H. C., Doull, J. M., "*Burkholderia cepacia* complex infection in patients with Cystic Fibrosis: laboratory investigations, epidemiology and clinical management" , **Reviews in medical Microbiology.**, 14(1):15-24 (2003).
60. Biddick, R., Spilker, T., Martin, A., LiPuma, J.J., "Evidence of transmission of *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia dolosa* among persons with Cystic fibrosis" , **FEMS Microbiol. Letters.**, 228:57-62(2003).
61. McDowell, A., Mahenthiralingam, E., Moore, E. J., Dunbar, E. A. K., Webb, A. K., Dodd, E. M., Martin, S. L., Milar, B. C., Scott, J. C., Crowe, M., Elborn, J. S., "PCR-Based detection and Identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens in sputum from Cystic fibrosis patients" , **J. Clin. Microbiol.**, 4247-4255 (2001).
62. Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E., Henry, D. A., Speert, D. P., "Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting" , **J. Clin. Microbiol.**, 12:2914-2920 (1996).
63. Winstanley, E., Detsika, G.M., Glendinning, J.K., Parsons, N.Y., and Hart, A. C., "Flagellin gene PCR-RFLP analysis of a panel of strains from the *Burkholderia cepacia* complex" , **J. Med. Microbiol.**, 50:728-731(2001).
64. Mahenthiralingam, E., Coenye, T., Chung, W. J., Speert, D. P., Govan, W. R. J., Taylor, P., and Vandamme, P., "Diagnostically and experimentally useful panel of strains from the *Burkholderia cepacia* complex" , **J. Clin. Microbiol.**, 38:910-913 (2000).

65. Segonds, C., Heulin, T., Marty, N., Chabanon, C., "Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-RFLP analysis of the 16S rRNA gene and application to CF isolates", *J. Clin. Microbiol.*, 37:2201-2208 (1999).
66. Mahenthiralingam, E., Vandamme, B., Campbell, M. E., Henry, A. D., Gravelle, M. A., Wong, T. K. L., Davidson, F. G., Wilcox, G. P., Nakielna, B., Speert, D., "Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with Cystic Fibrosis: Virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*", *CID.*, 33:1469-1475 (2001).
67. Woese Cr., "Bacterial evolution", *Microbiol Rev.*, 51:221-233 (1987).
68. Gobel U.B, Geiser A, Stanbridge E.J., "Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between *Mycoplasma* species", *J. Gen Microbiol.*, 133:1969-1974 (1987).
69. Baliernfeind, A., Roller, C., Meyer, D., Jungwirth, R., Schneider, I., "Molecular prodedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*", *J. Clin. Microbiol.*, 36:2737-2741(1998).
70. Wangratanacheewin, S., Komutrin, K., Sermswan, R. W., "Use of multiplex PCR patterns as genetic markers for *Burkholderia pseudomallei*", *Acta Trop.*, 2-3:193-1999 (2000).
71. Davidson, J.N., "The biochemistry of the nucleic acids", 8th ed. Orlando, FL: *Academic Press.*, 31-73 (1976).
72. Dutton G., "Advances in Polymerase Chain reaction", *Genetic Engineering News.*, 18-16 (1998).
73. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky J.J., "Recent advances in the polymerase chain reaction", *Science.*, 252 :1643-1651 (1991).
74. Mc Kane L., Kandel Y., "Microbiology Essentials and applications", Int. Edition. *Mc. Graw-Hill.Inc.*, Boston 33-45 (1996).
75. Prescott M.L. Harley, J., Klein, D., "Microbiology", Fourth Edition WOB *McGraw Hill.*, Boston 78-99 (1999).
76. Akar N., "Klinik Moleküler Patolojiye Giriş", *Ankara Antip A.Ş.*, 381 (1999).
77. Enleberg, N.C., "Molecular methods: Applications for clinical infectious diseases", *Ann. Amer. Med.*, 490-502 (1994).
78. Van Belkum, A., "DNA fingerprinting of medically important microorganisma by use of PCR", *Clin. Microb. Rev.*, 7:174-184 (1994).

79. Bingen, E.H., Denamur, E. And Elion, J., "Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks" , *Clin. Microbiol. Rev.*, 7:311-327 (1994).
80. Renders, N., Römling, U., Verbrugh, H., and Van Belkum, A., "Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments" , *J. Clin. Microbiol.*, 34:3190-3195 (1996).
81. Elaichouni, A., Verschraegen, G., Claeys, G., Devleeschouwer, M., Godard, C., and Vaneechoutte, M., "*Pseudomonas aeruginosa* serotype 012 outbreak studied by arbitrary primer PCR" , *J. Clin. Microbiol.*, 32:666-671 (1994).
82. Power, E.G.M., "RAPD typing in microbiology a technical review" , *J. Hosp. Infect.*, 34:247-256 (1996).
83. Meunier, J.R. and Grimont, P.A.D., "Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting" , *Res. Microbiol.*, 144 373-379 (1993).
84. Taguchi, G., Wu, Y., "Introduction to Off-Line Quality Control" , *Apan Quality Control Organisation*, Nagoya (1980).
85. Struelens, J. M., "Molecular Epidemiologic typing systems of bacterial Pathogens: >Current Issues and perspectives" , *Mem. Inst.*, Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 93(5):581-585 (1998).
86. Giordano, A., Magni, A., Graziani, C., Sessa, R., Quattrucci, S. and Cipriani P., "AP-PCR typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis" , *New Microbiol.*, 24(2):157-163 (2001).
87. Snowdon, R.J., Langsdorf, A., "An introduction to DNA fingerprinting using RFLP and RAPD techniques" , In: *Nucleic Acid Electrophoresis* (Tietz, D., Ed.), *Springer- Verlag*, Berlin 99-128 (1998).
88. Muralidharan, K., and Wakeland, E.K., "Concentration of primer and template qualitatively affects products in random amplified polymorphic DNA PCR" , *BioTechniques*, 14:362-363 (1993).
89. Tyler, K.D., Wang, G., Tyler, S.D. and Johnson, W.M., "Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens" , *J. Clin. Microbiol.*, 35:339-346 (1997).
90. DNA 500 Assay "Reagent Kit Guide" **Agilent Technologies**, April (2003)
91. Minuielle A.C. PhD., Qujati H., "Severine Dameron Detecting genetically modified organisms with the Agilent 2100 bioanalyzer" , *Application. Agilent Technologies.*, 1 (2003).

92. Sambrook, L., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular cloning: a laboratory manual" , 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*, N.Y. (1989).
92. O'Callaghan, E.M., Taner, M.S., Boulnois, G.J., "Development of PCR probe test for identifying *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia*" , *J. Clin. Pathol.*, 4:222-226 (1994).
93. Moore, J.E., Xu, J., Beverley, C.M., Crowe, M., and Elborn, J.S., "Improved molecular detection of *Burkholderia cepacia* genomovar III and *Burkholderia multivorans* directly from sputum of patients with cystic fibrosis" , *J. Clin. Microbiol. Methods.*, 49:183-191 (2002).
94. Mahenthiralingam, E., Campbell, M.E., Faster, J., Lam, J.S., Speert, D.P. "Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis" , *J. Clin. Microbiol.*, 34:1129-1135 (1996).
95. Speerti D. P., Bond, M. R., Woodman, C., and Curnutte, J.T., "Infection with *Pseudomonas cepacia* in chronic granulomatous disease: role of non-oxidative killing by neutrophils in host defence" , *J. Infect. Dis.*, 170:1524-1531 (1994).
96. Van Pelt, C., Verduin, C. M., Goessens, W. H. F., Vos, M. C., Tümler, B., Segonds, C., Reubsaet, F., Verbrugh, H., and Van Belkum, A., "Identification of *Burkholderia* spp. In the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods" , *J. Clin. Microbiol.*, 2158-2164 (1999).
97. Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., and Swings, J., "Polyhasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics" , *Microbio. Rev.*, 60:407-438 (1996).
98. Laguerre, G., Rigottier-Gois, L., and Lemanceau, P., "Fluorecent *Pseudomonas* species categorized by using PCR/restriction fragment analysis of 16S rDNA" , *Mol. Ecol.*, 3:479-487 (1994).
100. Lagatolla, C., Skerlavaj, S., Dolzani, L., Tonin, E. A., Bragadin, C. M., Bosco, M., Rizzo, R., Giglio, L., and Cescutti, P., "Microbiological characterisation of *Burkholderia cepacia* isolates from cystic fibrosis patients: investigation of the exopolysaccharides produced" , *FEMS Microbiology Letters*, 209:99-106 (2002).
101. Segonds, C., Heulin, T., Marty, N., and Chabanon, G., "Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the 16S rDNA gene and application to cystic fibrosis isolates" , *J. Clin. Microbiol.*, 2201-2208 (1999).

102. Bauernfeind, A., Roller, C., Meyer, D., Jungwirth, R., and Schneider, I., "Molecular Procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*" , ***J. Clin. Microbiol.***, 36:2737-2741 (1998).
103. Hales, BA., Morgan, J. A. W., Hart, C. A., Wistanley, C., "Variation in flagellin genes and proteins of *Burkholderia cepacia*" , ***J. Bacteriol.***, 180:1110-1118 (1998).
104. Woese C.R., "Bacterial evolution" , ***Microbial Rev.***, 51:221-233 (1987).
105. Pitt, T. L., and Govan, J. R. W., "*Pseudomonas cepacia* and cystic fibrosis PHLS" , ***Microbiol. Dig.***, 10:69-72 (1993).
106. Devereus, J., Haeberli, P., and Smithies, O., "A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX" , ***Nucleic. Acids Res.***, 12:387-395 (1984).
107. Giardano, A., Magni, A., Graziazni, C., Sessa, R., Quattrucci, S., Cipriani, P., "AP-PCR typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis" , ***New Microbiol.***, 24:157-163 (2001).
108. Dabrowski, W., Czejajlo-Kolodziej, U., Medrala, D., Giedrys-Kalemba, S., "Optimisation of AP-PCR fingerprinting discriminatory power for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*" , ***Fems Microbiol. Letters.***, 218:51-57 (2003).

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Balıkesir’de doğdu. İlkokulu Ordu, orta okulu Merzifon, lise öğrenimini ise Ankara’da tamamladı. 1989-1994 yılları arasında Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde okudu. 1996-1998 yılları arasında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Yüksek Lisans (Biyoloji) yaptı. 2000 yılında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nün açmış olduğu Doktora programını kazandı. 1995 yılından beri M.E.B.’na bağlı olarak Çankaya Özbirlik İlköğretim Okulu’nda Fen Bilgisi öğretmeni olarak çalışmaktadır. Evli ve bir kız çocuğu annesidir.