

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BURKHOLDERIA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
TİPLENDİRİLMESİ, TÜRLER ARASINDA BİYOFİLM OLUŞUMU VE
ANTİBİYOTİK DİRENÇ FARKLILIĞININ BELİRLENMESİ**

Uzm. Dr. Havva Özlem ALTAY AKIŞOĞLU

Mikrobiyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2019

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BURKHOLDERIA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
TİPLENDİRİLMESİ, TÜRLER ARASINDA BİYOFİLM OLUŞUMU VE
ANTİBİYOTİK DİRENÇ FARKLILIĞININ BELİRLENMESİ**

Uzm. Dr. Havva Özlem ALTAY AKIŞOĞLU

Mikrobiyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ayşe Gülşen HASÇELİK

ANKARA

2019

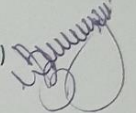
ONAY SAYFASI

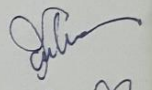
**BURKHOLDERIA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TİPLENDİRİLMESİ, TÜRLER
ARASINDA BİYOFİLM OLUŞUMU VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ FARKLILIĞININ BELİRLENMESİ**

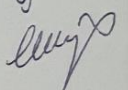
Öğrenci: Havva Özlem ALTAY AKIŞOĞLU

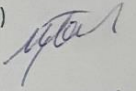
Danışman: Prof Dr Ayşe Gülşen HASÇELİK

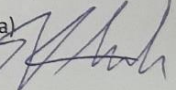
Bu tez çalışması 12 Aralık 2018 tarihinde jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Programı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof Dr Cumhur ÖZKUYUMCU (imza) 
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

Üye: Prof Dr Sevtap ARIKAN AKDAĞLI (imza) 
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

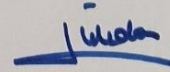
Üye: Prof Dr Zeynep Ceren KARAHAN (imza) 
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

Üye: Prof Dr İstar DOLAPÇI (imza) 
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

Üye: Doç Dr Alpaslan ALP (imza) 
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

15 Ocak 2019



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾



12/12/2018

HAVVA ÖZLEM ALTAY AKIŞOĞLU

¹ “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ayşe Gülşen HASÇELİK danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesi'ne göre yazıldığını beyan ederim.



Uzm Dr Havva Özlem ALTAY AKIŞOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca kıymetli birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, hoşgörüsünü ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Ayşe Gülşen HASÇELİK'e, bilgisi ve fikirleri ile bana sürekli destek olan Prof. Dr. Burçin ŞENER'e, bilimsel yaklaşım konusunda kendisinden çok değerli bilgiler öğrendiğim Yard. Doç. Dr. Doruk ENGİN'e, çalışmaya önemli katkılarda bulunan Doç.Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK ve Bio. Seyyide SARIÇAM'a teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde görüş ve önerileriyle çalışmalarına önemli katkı sağlayan Prof. Dr. Ceren KARAHAN ve Doç. Dr. Alpaslan ALP'e teşekkür ederim.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana her zaman destek olan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli hocaları ve teknik personeline teşekkür ederim.

Ayrıca, bu süreçte sabırla yanımda olan sevgili eşim Berkay AKIŞOĞLU'na ve her türlü fedakarlığı gösteren canım annem Sabriye ALTAY, canım babam Alim ALTAY ve canım kardeşim Betül ALTAY,'a hayatımın anlamını değiştiren biricik oğlum Batu AKIŞOĞLU'na minnettarım.

ÖZET

Altay Akışoğlu HÖ. *Burkholderia* Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Tiplendirilmesi, Türler Arasında Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotik Direnç Farklılığının Belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2019. Bu çalışmada, kistik fibrozisli (KF) ve KF olmayan hastalardan izole edilen *Burkholderia* türlerinin rutin mikrobiyolojik yöntemler ve multilokus sekans analizi (MLSA) ile tanımlanması, biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi, antibiyotik duyarlılıkları ve sinerjilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yirmialtı farklı hastaya ait 38 izolat *B. cenocepacia* (n:16), *B. contaminans* (n:11), *B. gladioli* (n: 4), *B. dolosa* (n:4), *B. multivorans* (n:2) ve *B. seminalis* (n:1) olarak belirlenmiştir. Tür düzeyinde MALDI-TOF MS ile doğru tanımlama %66 olarak bulunmuştur. Çalışılan izolatlarda biyofilm oluşumu %53 (n = 20) olarak belirlenmiş ve türler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. İzolatların seftazidim, meropenem, TMP-SXT ve levofloksasine karşı duyarlılıkları sırasıyla %66, %34, %50 ve %60 olarak belirlenmiştir. *Burkholderia* türlerine karşı antibiyotik direncinde, KF hastalarından elde edilen izolatlar seftazidime daha duyarlı bulunmuş, diğer antibiyotikler için anlamlı fark saptanmamıştır. İki izolatta meropenem ve TMP-SXT arasında sinerji gözlenmiştir. Onbeş izolatta antagonizma tespit edilmiş, bunun 12'si meropenem ile seftazidim, 3'ü seftazidim ile TMP-SXT arasında bulunmuştur. Bu çalışma KF ve KF olmayan hastalarda izole edilen *Burkholderia* spp. sekans sonuçlarının farkını, biyofilm oluşumunun bu bakteri ile oluşan enfeksiyonlarda önemli olduğunu ve tedavinin in vitro antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre değerlendirilmesi gerektiğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Burkholderia* spp., MALDI-TOF MS, multilokus sekans analizi, biyofilm, antibiyotik duyarlılık

Çalışma Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Kodu: THD-2016-10613

Öğrenci doktora eğitimi sırasında TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı 2214-A kapsamında desteklenmiştir. Proje Kodu: 1059B141601066

ABSTRACT

Altay Akisoglu HO. Molecular typing, biofilm production and antibiotic susceptibility tests of *Burkholderia* species. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, PhD, thesis in Microbiology, Ankara, 2019. The aim of this study was to identify *Burkholderia* spp. strains isolated from CF and non-CF patients with routine microbiological methods and multilocus sequence analysis (MLSA), to determine the antibiotic susceptibility and synergies, and to evaluate biofilm formation of these isolates. A total of 38 isolates from 26 patients identified as *B. cenocepacia* (n=16), *B. contaminans* (n=11), *B. gladioli* (n=4), *B. dolosa* (n=4), *B. multivorans* (n=2) and *B. seminalis* (n=1). Correct species-level identification of MALDI-TOF MS was 66%. Biofilm formation in these species was determined as 53% (n=20) and there was no statistical difference in biofilm production among *Burkholderia* species. Overall rates of susceptibility to ceftazidime, meropenem, TMP-SXT, and levofloxacin of the isolates was 66%, 34%, 50% and 60%, respectively. In antibiotic resistance against *Burkholderia* spp., isolates obtained from CF patients were more susceptible to ceftazidime, but no significant difference was found for other antibiotics. Synergy has shown between meropenem and TMP-SXT at two isolates. Antagonism has detected at 15 isolates, 12 of them were between meropenem and ceftazidime, three of them were between ceftazidime and TMP-SXT. This study identifies the distinctness of sequence types between *Burkholderia* spp. isolated from CF and non-CF patients provide a better understanding of the importance of biofilm formation for the infections with these bacteria and emphasize the management of therapy should be driven by the antibiotic test results.

Key words: *Burkholderia* spp., multilocus sequence analysis, biofilm, antibiotic susceptibility tests

The study was supported by Hacettepe University BAP Coordination Unit. Project Code: THD-2016-10613

During the Ph.D. program, the student was supported by TÜBİTAK 2214-A International PhD Research Scholarship Program. Project Code: 1059B141601066

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Mikrobiyolojik Özellikler	3
2.2 Taksonomi	3
2.3 Epidemiyoloji	7
2.3.1 Tiplendirme	9
2.4 Patogenez	11
2.5 Klinik (KF ve Burkholderia)	15
2.6 Tanı	16
2.7 Antibiyotik Duyarlılık	21
2.7.1 Burkholderia Türlerinde Önerilen Antibiyotik Duyarlılık Yöntemi ve Kullanılan Antibiyotikler	23
2.7.2 Burkholderia Türlerinde Sinerji Testleri	24
2.7.3 Burkholderia Türlerinde Direnç Mekanizmaları	25
2.8 Tedavi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1 Bakteri İzolatları	28
3.2 Bakteri İzolatlarının Rutin Yöntemlerle Tanımlanması	28

3.3 Bakteri İzolatlarının Multilokus Sekans Analizi ile Tanımlanması	29
3.3.1 DNA İzolasyonu	29
3.3.2 Multilokus Sekans Tiplendirmesi (MLST)	30
3.4 Mikroplak Yöntemi ile Biyofilm Üretiminin Değerlendirilmesi	34
3.5 Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi	35
3.6 Sinerji Testi ile Antibiyotik Kombinasyonlarının Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi	38
3.7. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR	68
8. EKLER	
EK-1 Turnitin Orjinallik Raporu Dijital Makbuz	
EK-2 Turnitin Orjinallik Raporu Ekran Görüntüsü	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGE VE KISALTMALAR

ADT	Antibiyotik Duyarlılık Testi
Bcc	<i>Burkholderia cepacia</i> kompleksi
BcCV	<i>Burkholderia cepacia</i> içeren vakuol
CAZ	Seftazidim
CFTR	‘Cystic fibrosis Transmembrane Regulator’
DNA	Deoksiribonükleik asit
EPS	Ekzopolisakkarit
FİK	Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon
KA-MHB	Kasyon Ayarlı Mueller Hinton Broth
KF	Kistik fibrozis
LPS	Lipopolisakkarit
MALDI-TOF MS	Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
MEM	Meropenem
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MLSA	Multilokus Sekans Analizi
MLST	Multilokus Sekans Tiplendirme
PCR	‘Polymerase Chain Reaction’ (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PFGE	‘Pulsed-field’ jel elektroforezi
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
rep-PCR	Tekrarlayan elemanlar PCR
ST	Sekans tipi
TMP-SXT	Trimetoprim-sülfametoksazol

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1 Burkholderiaceae ailesine ait filogenetik ağaç	6
2.2 <i>Burkholderia cepacia</i> kompleksinin önemli biyokimyasal ve fenotipik özellikleri	17



TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1 <i>Burkholderia cepacia</i> kompleks sınıflaması	5
3.1 MLST PCR amplifikasyonu sıcaklık ve döngü koşulları	31
3.2 MLST PCR amplifikasyonunda kullanılan ‘housekeeping’ genler ve kullanılan primer dizileri	31
3.3 MLST PCR karışımı	31
3.4 DNA dizi analizinde kullanılan primer dizileri ve bağlanma sıcaklıkları	33
3.5 DNA dizi analizi için gerekli PCR reaksiyonu bileşen ve hacimleri	33
3.6 DNA dizi analizi PCR sıcaklık ve döngü koşulları	33
3.7 Antibiyotik solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan çözücü ve seyrelticiler	36
4.1 <i>Burkholderia</i> türlerinin yaş, cins ve örnek türlerine göre dağılımı	42
4.2 <i>Burkholderia</i> türlerinin MLSA sonuçları	44
4.3 <i>Burkholderia</i> türlerinin MLSA sonuçlarının MALDI-TOF MS ile karşılaştırılması	45
4.4 <i>Burkholderia</i> türlerinin biyofilm oluşumu	46
4.5 KF ve KF olmayan hastalardan izole edilen <i>Burkholderia</i> türlerinin biyofilm oluşumu	46
4.6 <i>Burkholderia</i> türlerinin MALDI-TOF, MLSA ve biyofilm sonuçları	47
4.7 <i>Burkholderia</i> türlerinin antibiyotik duyarlılıkları	48
4.8 KF ve KF olmayan hastalardan izole edilen <i>Burkholderia</i> türlerinin antibiyotik duyarlılıkları	49
4.9 <i>Burkholderia</i> türlerinin sinerji sonuçları	49
4.10 <i>Burkholderia</i> türlerinin antibiyotik duyarlılık ve sinerji testi sonuçları	50
4.11 Dirençli <i>Burkholderia</i> türlerinin biyofilm oluşumu	52

1. GİRİŞ

Burkholderia türleri doğada yaygın olarak bulunan, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi morbidite ve mortaliteye neden olabilen, aerobik, gram negatif, non-fermenter basillerdir. *Burkholderia cepacia* kompleksi (Bcc) kistik fibrozis (KF) ve kronik granülomatoz hastalığı bulunan insanlarda asemptomatik taşıyıcılıktan ölümcül pnömoniye kadar değişen klinik tablolara neden olmaktadır. Bu türlerin aynı zamanda hastane salgınları, santral venöz kateter ilişkili enfeksiyon, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve genitoüriner sistem enfeksiyonları oluşturduğu da gösterilmiştir. Kistik fibrozis hastalarında en sık görülen Bcc türlerini inceleyen epidemiyolojik çalışmalarda, hastalığa neden olan tür ve antibiyotik duyarlılıklarının farklı olduğu ve ülkelerarası farklılıklar bulunduğu saptanmıştır. Bu nedenle, *Burkholderia* türlerinin tür düzeyinde doğru tanımlanması hasta yönetimi ve ulusal antimikrobiyal direnç surveyansı açısından önem taşımaktadır.

Burkholderia türlerinin rutin olarak tanımlanmasında fenotipik ve biyokimyasal yöntemlere ek olarak matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntemlerle tür düzeyinde tanımlama yapmak her zaman doğru sonuç vermemektedir. Bu türlerin kesin ayrımında güvenilir, hızlı ve uygun maliyetli yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiş olup her birinin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar arasında yer alan multilokus sekans analizi yakın türlerin ayrımı için kullanılan, birden çok lokusun dizilenmesi esaslı güvenilir bir moleküler sınıflandırma yöntemidir.

Burkholderia türlerinin hastalık oluşturabilme yeteneği ve tedaviye yanıtı türler arasında farklılıklar göstermektedir. Önemli virülans faktörlerinden biri olan biyofilm özelliğine sahip bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonun ortadan kaldırılması genellikle mümkün olamamaktadır. Aynı türden olmasına rağmen biyofilm oluşturan bakteriler, biyofilmin bariyer fonksiyonu, durağan hücrelerin düşük üreme hızı ve/veya direnç genlerinin ekspresyonu nedeniyle immün sisteme ve antimikrobiyallere karşı daha dayanıklı hale gelmektedir.

Burkholderia türleri penisilinler, sefalosporinler, aminoglikozidler ve polimiksinler gibi antibiyotiklere içsel olarak dirençlidir. Enfeksiyonların prevalansı ve tedavi yanıtlarını inceleyen araştırmalar *Burkholderia multivorans* ve *Burkholderia cenocepacia*'nın daha yüksek bulaş oranları ve mortaliteye neden olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı, KF ve KF olmayan hastalardan izole edilen *Burkholderia* türlerini rutin mikrobiyolojik yöntemler, MALDI-TOF MS ve multilokus sekans analizi ile tanımlamak, izolatlarda biyofilm oluşumunu, antibiyotik duyarlılık durumunu ve kombine antibiyotik sinerjisini değerlendirmektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Mikrobiyolojik Özellikler

Burkholderia cepacia kompleks (Bcc) bakterileri 1,6-3,2 µm uzunluğunda, aerobik, hareketli, gram negatif basillerdir. Katalaz reaksiyonu pozitif, oksidaz reaksiyonu türlere göre değişmekle birlikte genellikle zayıf pozitifdir (1). Bu türlerin tamamı glikoz, gliserol, inositol, galaktoz, sorbitol ve mannitolü tek karbon kaynağı olarak kullanabilir. Diğer önemli ayırt edici özellikleri arasında nitrat redüksiyonunun ve lizin dekarboksilaz aktivitesinin pozitifliği ve arjinin dehidrolaz aktivitesinin negatif olması bulunmaktadır (2).

Burkholderia cepacia kompleks türleri yüksek düzeyde 16S rRNA gen dizisi benzerliği (>%97,5) ve orta düzeyde DNA-DNA hibridizasyon değerlerine (%30-60) sahip yakın ilişkili türlerdir. Olağandışı büyüklükteki genomları (6,2-8,7 Mbp) üç sirküler kromozom ve 1-5 adet geniş plazmid bulundurmakta olup, %59-69,5 oranında G+C baz bileşimine sahiptirler (3).

2.2 Taksonomi

Burkholderia cinsi taksonomik olarak Betaproteobacteria sınıfı içinde *Burkholderiaceae* ailesinde bulunmaktadır. *Burkholderia* bakterileri ilk olarak 1940'larda Cornell Üniversitesi'nde bir bitki patoloğu olan Walter Burkholder tarafından soğan çürümesinin nedeni olarak izole edilmiş ve *Pseudomonas cepacia* olarak isimlendirilmesi önerilmiştir. Birkaç yıl sonra insanlarda patojen olduğu bildirilmiştir (4).

Yabuuchi ve ark. (5) tarafından 1992 yılında rRNA group II pseudomonadlar altında sınıflanan yedi tür (*Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas pickettii*, *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pseudomallei* ve *Pseudomonas caryophylli*), yeni bir cinse aktarılmış ve Burkholder'in çalışmalarını onurlandırmak için bu yeni cins *Burkholderia* olarak tanımlanmıştır. Bu sınıflandırmanın ardından birkaç *Pseudomonas* türü daha sonraki çalışmalarda *Burkholderia* türleri olarak yeniden sınıflandırılmış ve daha önce

adlandırılan *Burkholderia* türlerinin ikisi (*Burkholderia pickettii* ve *Burkholderia solanacearum*) yeni *Ralstonia* cinsine aktarılmıştır (6).

Takip eden yıllarda, *Burkholderia* türlerinde yeni birçok tür bulunmuş ve tanımlanmıştır. Son yıllarda bu bakterilerin taksonomisinde geliştirilmiş tanımlama algoritmaları oluşturulmuş olmakla birlikte, bu türlerin *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Comamonas* ve *Delftia* türleri gibi diğer ilgili taksonlardan güvenilir şekilde ayırt edilmesi zordur (7). Günümüzde, bu cins altında 100'den fazla tür bulunduğu bildirilmiştir (8).

1990'ların başından itibaren, birçok araştırmacı geleneksel ve moleküler tanımlama yaklaşımlarını (seçici besiyerinde üreme, klasik biyokimyasal testler ve ticari biyokimyasal mikrotest sistemleri, tam hücre yağ asidi analizi ve çeşitli PCR tabanlı teknikler) kullanarak *Burkholderia* cinsi içinde yer verilen farklı ekolojik kaynaklardan izole edilen *B. cepacia* suşları arasında belirgin heterojenite olduğunu bildirmişlerdir (9). Vandamme ve ark. (10) 1997 yılında *Burkholderia cepacia* suşları arasındaki çeşitlilik ve güvenilir tanımlama şemalarının eksikliği nedeniyle polifazik taksonomik çalışma yürütmüştür. Bu çalışmada, kistik fibrozisli hastalarından, klinik örneklerden ve çevreden izole edilmiş *B. cepacia* izolatları tüm hücre protein elektroforezi, tüm hücre yağ asidi metil ester analizleri ve DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyonları kullanılarak değerlendirilmiş, bu bakterilerin en az beş ayrı genomu ait olduğunu bildirilmiş ve toplu olarak *Burkholderia cepacia* kompleksi olarak adlandırılmıştır.

Daha sonraki yıllarda türe özgü PCR testi, ribotiplendirme, PCR ile çoğaltılmış gen fragmanlarının restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi analizi ve tRNA profillemesi gibi moleküler yöntemlerin bir kısmı, Bcc'nin doğru tanımlama ve sınıflandırma açısından yararlı olduğunu kanıtlasa da, bu tür kompleksinde yeni üyelerin düzenli olarak ortaya çıkması nedeniyle bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin sürekli yeniden değerlendirilmesi gerekli olmuştur (11).

Son yıllarda, *recA* geni ve multilokus dizileme temelli yaklaşımlar tanımlama ve sınıflandırma amaçlı olarak ortaya çıkmıştır. Güncel taksonomik çalışmalar sonucu Bcc'nin moleküler ve biyokimyasal testler temelinde ayırt edilebilen genomik olarak yakın ilişkili en az 20 türden oluşan bir küme olduğu anlaşılmıştır (12).

Burkholderia cepacia kompleksi'nde yer alan türlerin listesi Tablo 2.1'de ve *Burkholderiaceae* ailesine ait filogenetik ağaç Şekil 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 *Burkholderia cepacia* kompleks sınıflaması

1. <i>Burkholderia ambifaria</i>
2. <i>Burkholderia anthina</i>
3. <i>Burkholderia arboris</i>
4. <i>Burkholderia cenocepacia</i>
5. <i>Burkholderia cepacia</i>
6. <i>Burkholderia contaminans</i>
7. <i>Burkholderia diffusa</i>
8. <i>Burkholderia dolosa</i>
9. <i>Burkholderia lata</i>
10. <i>Burkholderia latens</i>
11. <i>Burkholderia metallica</i>
12. <i>Burkholderia multivorans</i>
13. <i>Burkholderia pseudomultivorans</i>
14. <i>Burkholderia pyrrocinia</i>
15. <i>Burkholderia seminalis</i>
16. <i>Burkholderia stabilis</i>
17. <i>Burkholderia ubonensis</i>
18. <i>Burkholderia vietnamiensis</i>
19. <i>Burkholderia stagnalis</i>
20. <i>Burkholderia territorii</i>
21. <i>Burkholderia puraquae</i>
22. <i>Burkholderia catarinensis</i>



Şekil 2.1 *Burkholderiaceae* ailesine ait filogenetik ağaç (11)

2.3 Epidemiyoloji

Burkholderia türleri doğada yaygın olarak bulunan ve aylarca yaşayabildiği su, toprak ve nemli ortamlardan kolayca izole edilebilen bakterilerdir. Ayrıca seyreltilmiş dezenfektanlarda üreyebildikleri için, hastane malzemeleri ve cihazlarını kontamine etmekte ve özellikle immün sistem yetersizliği olan hasta gruplarının yattığı servislerde ve yoğun bakım ünitelerinde önemli problemler oluşturmaktadır (13).

Çeşitli Bcc salgınlarının kontamine ilaç, tıbbi ürün ve ekipmanlar nedeniyle meydana geldiği belirlenmiştir. Örneğin 2004 yılında, reçetesiz satılan oksimetazolin içeren burun spreylelerinin Bcc ile kontamine olduğu ve ABD'de birden fazla eyalette birçok hastayı enfekte ettiği saptanmıştır (14). Ağustos 2004'te, Bcc ile kontamine sublingual problemler nedeniyle Teksas'ta bir hastanede mekanik ventilasyon alan yoğun bakım ünitesindeki 13 KF hastasında nozokomiyal solunum yolu enfeksiyonu gelişmiştir (15). 2015 yılında Kore'de yenidoğan yoğun bakım ünitesinde kontamine antiseptikler ve İsviçre genelinde kontamine yıkama eldivenleri Bcc salgınına neden olmuştur (16,17). Ülkemizde ise 2009 yılında üriner sistoskopi aletinin *B.cepacia* ile kontaminasyonu nedeniyle sekiz hastada sistoskopik girişim sonrası idrar yolu enfeksiyonu bildirilmiştir (18). Günümüzde Bcc tarım endüstrisinde, özellikle Çin'de, bitki patojenlerinin antagonisti olarak ve biyoremediasyon uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tarımsal uygulamaların neden olacağı su kontaminasyonu sonrasında bitki, hayvan ve insanlarda enfeksiyona yol açabileceği düşünülmektedir. Örneğin, Baldwin ve ark. (19) klinik Bcc izolatlarının %20'sinden fazlasının doğal ortamda bulunan izolatlarla benzer sekans tipinde olduğunu bildirmişlerdir.

Burkholderia cepacia kompleks bakterileri esas olarak kistik fibrozisli ve bronşiektazili hastaların solunum yollarını kolonize ve enfekte etmektedir. Bu türlerin kişiden kişiye bulaşı, doğrudan veya dolaylı olarak, temas ve/veya damlacık yolu ile meydana gelir. Tüm Bcc türlerinin KF hastaları için olası patojenler olduğu düşünülmektedir. Kistik fibrozis hastalarında Bcc enfeksiyonlarının sıklığı değişken olmakla birlikte, klinik izolatların coğrafi ve bölgesel dağılımını gösteren epidemiyolojik çalışmalar *Burkholderia cenocepacia*'nın en yaygın görülen tür olduğunu ve bunu *B. multivorans*'ın takip ettiğini göstermektedir (20,21).

Kuzey Amerika'daki kistik fibrozis merkezlerinde, *B. cepacia* izolatlarının insidans ve prevalansının 1980'lerin başında arttığı, 1980'li ve 1990'lı yıllarda yapılan çalışmalarda ise belirli suşlarla meydana gelen kronik enfeksiyon olguları gözlenmiştir (22). Bunun yanında, Avrupa ve Kuzey Amerika'da KF merkezlerinde kolaylıkla yayılım gösteren bazı virulan suşlarla meydana gelen birçok salgın bildirilmiştir. Bu yayınlarda *B. cepacia* enfeksiyonu olan kistik fibrozisli hastalarda morbidite ve mortalitenin de artmış olduğuna dikkat çekilmiştir (23).

Burkholderia cepacia'nın KF ve KF olmayan hastalar arasında yayılabildiği 1988-1993 yılları arasında yapılan bir olgu kontrol çalışmasında gösterilmiştir (24). *Burkholderia cepacia* pozitif kişiler üzerinde yapılan çalışmalarda mevcut *B. cepacia* enfeksiyonunun daha virulan ve bulaş oranı yüksek izolatlarla yer değiştirdiği bildirilmiştir (25). Bununla birlikte, kistik fibrozisli kardeşler arasında bu bakterilerin yayılımının mutlak olmaması nedeniyle, hastalar arası yayılımın tür bağımlı bir özellik olabileceği düşünülmüştür (26). *Burkholderia cepacia* kompleksi ile meydana gelen çapraz enfeksiyonların en olası nedeni olarak 1998 ve öncesi KF hastaları arasında çok popüler olan yaz kamplarındaki sosyal temaslar düşünülmekteydi. Kistik fibrozis merkezleri ve sosyal ilişkiler nedeniyle hastaların bir arada bulunduğu ortamlarda yapılan ve moleküler parmak izi teknikleri kullanılan çalışmalar, bu enfeksiyonun bulaşında doğrudan hastadan hastaya yayılım olduğunu kanıtlamıştır (27). Bu suşların doğal rezervuarının çevrede olduğu düşünülmekle beraber, henüz kesin bir kanıt bulunmamaktadır. Bununla birlikte, 2002 yılında topraktan izole edilmiş bir *B. cenocepacia* suşu, farklı yöntemlerle tiplendirilmiş ve klinik izolatlardan ayırt edilemeyeceği gösterilmiştir. Bu araştırma Bcc'nin çevreden alınmasının mümkün olduğunu ve KF hastalarında enfeksiyonun neden elimine edilemediğini açıklamaktadır (28).

Burkholderia cenocepacia'nın Avrupa ve ABD'deki kistik fibrozis merkezleri arasında yayıldığına gösterilmesi sonucu 2003 yılında yayınlanan ve 2013 yılında güncellenen enfeksiyon önleme ve kontrol önerilerinin ardından, hastadan hastaya bulaşma ve çevreden edinme riskini azaltmaya yönelik stratejiler ciddiyle uygulanmış ve Bcc enfeksiyonlarının prevalansında belirgin bir azalmanın olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, uygulanan politikaların Bcc ile enfekte olan hastalar üzerinde sosyal izolasyon ve olumsuz psikolojik etkileri görülmüştür. Ayrıca bu

uygulamalar suşların bulaşını önlemede etkili olmakla beraber, yeni tanılarının ortaya çıkmasını engelleyememiştir. Yine de bu enfeksiyon önleme çabalarının yoğunluğu sayesinde ABD’de ve Avrupa’daki ülkelerin büyük kısmında bulunan kistik fibrozis merkezlerinde, Bcc enfeksiyonu prevalansı %20 civarından %5’in altına düşürülmüştür. Kronik Bcc enfeksiyonu prevalansı Danimarka, Portekiz, Slovakya, Rusya ve Litvanya’da %5-10, Sırbistan ve Litvanya’da ise sırasıyla %15 ve %23 olarak görülmektedir (29-31).

Literatürde ülkemizde KF hastalarında Bcc enfeksiyonu sıklığı ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında iki yayına ulaşılmıştır. Şener ve ark. (32) tarafından 1996 yılında yapılan bir çalışmada 55 KF hastasından beş yıllık bir dönemde elde edilen 976 balgam örneğinde fenotipik yöntemler kullanılarak hastaların %3,6’sında *B. cepacia* tespit edilmiştir. 2002 yılında Ocak ve ark. (33) tarafından KF hastalarında fenotipik testlerle değerlendirilen bir çalışmada ise 129 hastadan alınan 286 balgam örneği arasında iki ayrı (%1,5) hastada *B. cepacia* saptanmıştır.

Kanada, ABD ve birçok Avrupa ülkesinde meydana gelen yeni Bcc enfeksiyonlarının epidemik olmayan *B. cenocepacia*, klonal olmayan *B. multivorans* veya diğer Bcc suşları tarafından kaynaklandığı dikkati çekmektedir. KF hastalarında klonal olmayan Bcc türlerinin izole edilmesi enfeksiyonun hastalar arası çapraz bulaşmalardan ziyade çevresel kaynaklardan edinildiğini düşündürmektedir. *Burkholderia* türlerinin henüz bulunmamış çevresel nişlerini analiz etmek ve uygun önleme tedbirlerini uygulamak için daha ileri çalışmalar gereklidir (34).

2.3.1 Tiplendirme

Kistik fibrozis hastalarında Bcc epidemiyolojisinin genotiplendirme yöntemleri ile analizi sürveyans için çok önemlidir. *Burkholderia cenocepacia* ’ya ait epidemik suşlarda *cblA* pilin geni, IS1363 insersiyon dizisi ve patojenite adasında bulunan BCESM (*Burkholderia cepacia* epidemic strain marker’) bulaşıcılık belirteçleri olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, bazı epidemik soylarda bu genetik belirteçler bulunsun bile diğerlerinde saptanmamıştır, bu nedenle epidemiyolojik sürveyans ve çapraz bulaşmanın tam olarak anlaşılması için genotiplendirme çalışmaları gerekmektedir (35, 36).

Moleküler tiplendirme yöntemleri arasında en çok kullanılanlar ribotiplendirme, ‘Pulsed-field’ jel elektroforezi (PFGE), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD), tekrarlayan elemanlar PCR (rep-PCR) ve multilokus sekans tiplendirmesidir (MLST). Kromozomal DNA’nın kesilmesi sonrası PFGE yöntemi, uzun yıllar bakteriyel tiplendirmede altın standart olarak kabul edilmiş ve Bcc'nin moleküler epidemiyolojisinde yaygın olarak uygulanmıştır. Ancak, PFGE oldukça zahmetli bir teknik olduğundan ve sonuçlarını farklı laboratuvarlar arasında karşılaştırmak zor olduğundan, günümüzde KF patojenleri için tercih edilen genotiplendirme yöntemi olarak MLST kullanılmaktadır (37-39).

Genom dizilemesi, salgın araştırması ve epidemiyolojik eğilimlerin tanımlanmasında esastır. Multilokus sekans tiplendirmesi bakteriyel izolatların yedi ‘housekeeping’ gen fragmanlarına ait dizileri karşılaştırmakta ve elde edilen allel profiliyle suşları karakterize ederek ayırt etmektedir. Her bir ‘housekeeping’ gen için, sekans varyantları ayrı allel olarak ve her allel profili spesifik bir sekans tipi (ST) olarak tanımlanmaktadır (40). Diğer genotiplendirme yöntemleriyle karşılaştırıldığında, MLST farklı laboratuvarlar arasında kolay ve güvenilir bir şekilde karşılaştırılabilen, belirgin ve tekrarlanabilir sonuçlar veren bir yöntemdir. Mevcut veritabanlarında bulunan iki binden fazla Bcc izolatının MLST profilleri serbestçe kullanılabilir. Bu tekniğin dezavantajları oldukça pahalı ve zaman alıcı olmasıdır. Bu nedenle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanımı veya ulusal sürveyans programlarında geniş bir izolat koleksiyonunun genotiplendirilmesi günümüzde mümkün olamamaktadır. Bu nedenle rutin ya da büyük ölçekli analizlere olanak sağlamak amacıyla, tam dizileri analiz etmek yerine MLST genlerinde sadece tek nükleotid polimorfizmlerini hedefleyen SNaPBcen analizi; MLST'ye dayanan ve özellikle küresel olarak dağılmış epidemik suşlara spesifik olan PCR analizi veya multilokus variable number tandem repeat analizi gibi alternatif yöntemler geliştirilmiştir (41, 42).

2.4 Patogenez

Son 20 yılda, Bcc virülans faktörleri ve determinantları ile ilgili birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen, bu virülans faktörlerinin enfeksiyon sürecindeki rolleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bakteriye ait yüzey yapıları virülans faktörleri olarak dikkati çekmektedir. Bu yapılar; bakterinin hareketi, akciğer yüzeyine adherensin artırılması ve akciğer epitel hücrelerine invazyonun sağlanması gibi bakterinin konak hücresi ile etkileşiminin başlangıç aşamasında önemli rol oynamaktadırlar. Bunun yanında, *B. cenocepacia* türlerinin çoğu akciğerdeki primer hücresel savunma mekanizmalarından kaçarak, solunum yolu epiteli hücrelerinde ve makrofajlarda hücre içi yaşama ve çoğalma yeteneğine sahiptir. Ayrıca ekzopolisakkarit biyosentezi, biyofilm oluşumu, antibiyotik direnci, ortamdaki demiri kullanabilme, oksidatif stres direnci gibi virülans faktörlerinin Bcc patogenezinde önemli olduğu bilinmektedir. Çeşitli gen regülasyon sistemleri (quorum sensing, alternatif sigma faktörleri veya ShvR ve AtsR gibi global düzenleyiciler) önemli virülans faktörlerini kontrol etmektedir. *Burkholderia cepacia* kompleks'in in vitro koşullarda küçük koloni varyantları oluşturabildiği gösterilmiştir. Küçük koloni varyantlarının antibiyotik direnci ve sağkalım ile ilişkisi bulunmaktadır (43).

Burkholderia türlerinin önemli virülans faktörleri:

a) Lipopolisakkarit: Gram negatif bakterilerin esas komponentlerden biri olan lipopolisakkarit (LPS) yapısında lipid A, çekirdek oligosakkarit ve O-antijeni bulunmaktadır. *Burkholderia cepacia* komplekse ait bakterilerdeki LPS'nin diğer gram negatif bakterilerdenki farkı, oligosakkaritte heterodimerik disakkarit olan D glisero-D-talo-okt-2-ulosonikası-(2-4)-3-deoksi-D-manno-okt-2-ulosonikası bulunması, lipid A ve çekirdek oligosakkaritin 4-amino-4-deoksiarabinoz içermesi ve O antijen yapısının değişik olmasıdır. Bu özel yapıların bileşimi bakteri yüzeyindeki elektriksel yükü değiştirerek antibiyotiklerin bağlanmasını inhibe etmekte ve bakteriyel enfeksiyonun kalıcı olmasına katkıda bulunmaktadır (44).

b) Hareket: Kamçı sadece bakterileri hareket ettirmekle kalmayıp, adhezin görevi de gören ve konakçı hücrelere patojenlerin girmesini sağlayan önemli bir virülans faktörüdür. Kistik fibrozis balgamını taklit eden bir besiyerinde üretilmiş *B.*

cenocepacia'nın farklı besin koşullarında hücre yüzeyinde çoklu kamçı sentezini indükleyerek, hareket ve flajellin ekspresyonunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir (45).

c) Hücre içinde hayatta kalma: Bu bakterilerin, makrofajlarda fagolizozomların oluşmasını geciktirme kabiliyetine sahip oldukları gösterilmiştir. *Burkholderia cenocepacia* içeren vakuollerin (BcCV) erken fagozomal evreye normal olarak ilerlediği ancak geç endozom ile füzyonu ve daha sonraki aşamaları önemli ölçüde geciktirdiği gösterilmiştir. Isıyla öldürülen bakterilerin fagolizozomlarda pH 4,5 olurken, BcCV'nin lümenindeki pH'ı 6,4 civarında tutarak asitleştirmediği belirlenmiştir (46).

d) Protein sekresyon sistemleri: Gram negatif ve gram pozitif bakteriler, direkt olarak çevreye veya konakçı hücrelere toksinleri ya da diğer proteinleri salgılamak için protein salgılama sistemlerini kullanırlar. *Burkholderia cenocepacia*'da ayrıntılı çalışılan protein sekresyon sistemlerinin altı tip olduğu ve virulanstaki rolleri belirlenmiştir. Tip I ve II sekresyon sistemleri (T1SS, T2SS), hemolitik proteinlerin salgılanmasında, T2SS ise iki çinko metaloproteaz, ZmpA ve ZmpB sekresyonunda rol oynadığı saptanmıştır. Bakteriyel patojenez için T3SS önemli olmasına rağmen, hücre içi sağkalımında rol oynamadığı görülmektedir. Fagositlerde hücre içi sağkalım için T4SS'nin gerekli olduğu belirlenmiştir. Dört adet T5SS'in, bakteriyel adezyonda rol oynadığı düşünülmektedir. Makrofajlarda bakteri içeren vakuolun lizozom kompleksiyle birleşmesini T6SS engellemektedir (47).

e) Demir alımı: Demir şelasyonu ve alımını gerçekleştirmek için Bcc türleri ornibaktin (ornibactin), piyoşelin (pyochelin), sepabaktin (cepabactin) ve sepasiaşelin (cepaciachelin) olmak üzere dört farklı siderofor üretebilmektedir. Ornibaktin, *B. cenocepacia* suşlarının ürettiği en önemli siderofor olarak görünmektedir. *Burkholderia cepacia* kompleks bakterileri ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi diğer KF akciğer kolonizasyonu yapan organizmaların mevcut demir için rekabeti bilinmekte birlikte, Bcc türlerinin konak proteinlerden nasıl demir elde ettikleri tam olarak belirlenmemiştir (48).

f) Biyofilm: Biyofilm, hücrelerin birbirine ya da bulundukları yüzeye yapıştıkları bir mikroorganizma kümesidir. Birbirine bağlı hücreler kendileri tarafından üretilen ve üç boyutlu bir yapı içinde kurulmuş hücre dışı polimerik bir

maddenin içine gömülüdürler. Biyofilmler mikroorganizma açısından faydalı ve kompleks sistemler olup polisakkarit, protein, lipid ve hücre dışı DNA'dan meydana gelmektedir (49).

Polisakkarit moleküllerinin organizasyonu, biyofilm hücreleri arasındaki boşluğu doldurularak mekanik stabilite sağlar ve biyofilmdeki organizmaların fizyolojik aktivitesini belirler. *Burkholderia cepacia* kompleks tarafından en yaygın üretilen ekzopolisakkarit olan cepacian klinik ve çevre izolatlarında bulunmaktadır. Cepacian, nötrofillerin fagositozunu engelleyerek ve nötrofillerin reaktif oksijen türlerinin üretmesini inhibe ederek enfeksiyonun kronikleşmesinde önemli olduğu belirtilmektedir. *Burkholderia cenocepacia* J2315 suşunda *bceB* geninde çerçeve mutasyonu nedeniyle putatif bir glikoziltransferaz kodlandığı için cepacian üretimi bulunmamaktadır (50,51).

Canlı ve cansız yüzeylerde yaygın olan biyofilmler, dünya üzerinde hastane enfeksiyonlarının %65'inden fazlasının sorumlusu iken, doğadaki bakterilerin %99'unun biyofilmlerde bulunduğu tahmin edilmektedir (52). Biyofilmlerin neden olduğu kronik enfeksiyonlar hastanede yatış oranları, sağlık bakım maliyetleri, mortalite ve morbidite oranlarının artmasına neden olmaktadır. *Burkholderia* türleri, planktonik kültürlerle karşılaştırıldığında biyofilm içerisinde çok farklı özelliklere sahip oldukları bilinmektedir. Biyofilm sayesinde bakteriler çevresel zararlı etkenlerden, konak savunma sisteminden ve antimikrobiyal ajanlardan korunarak kronik enfeksiyonlara yol açmaktadır. Üst ve alt solunum yolu hastalıkları, doğal kapak endokarditi, kronik orta kulak iltihabı, göz enfeksiyonları, kronik yaralar, diyabetik ayak ülserleri, idrar yolu enfeksiyonları ve periodontit gibi hastalıkların biyofilmle ilişkili bulunduğu belirtilmektedir (53,54).

Biyofilmlerdeki heterojenlik ve bakteriler arası iletişim, tek bir topluluğun ortaklaşa hareket etmesini sağlayarak çoklu direnç mekanizmalarının aktarılmasını kolaylaştırmaktadır. Quorum sensing, bakteri popülasyonundaki yoğunluğa bağlı olarak gen ekspresyonunun regülasyonunun düzenlenmesi ile ilişkilidir. *Burkholderia cepacia* kompleks türleri en az dört quorum sensing sistemine sahiptir. CepIR, CciIR, CepR2 ve BDSF sistemleri *B. cenocepacia* tarafından kodlanmaktadır. CepIR ve CciR sinyal molekülü olarak acyl homoserin laktonları kullanırken, BDSF cis-2-dodecenoic asit kullanmaktadır. CepR2 ise 'orphan' quorum sensing sistemi

olarak bilinmektedir (55). *Burkholderia cepacia* kompleks türlerinde quorum sensing tarafından regüle edilen genler siderofor sentezinin negatif regülasyonu, çinko metalloprotezlari kodlayan genlerin pozitif regülasyonu, hareket ve biyofilm oluşumu ile ilişkili olup KF hastalarında oluşan enfeksiyonlarda bakteriye avantaj sağlamaktadır (56). Ayrıca biyofilm matriksi hücre-hücre teması için uygun bir ortam sağlayarak mobil genetik elemanların transferini kolaylaştırır. Biyofilmlerde yatay gen transferinin yaygın mekanizması plazmid konjugasyonudur. Serbest yaşayan bakterilerle karşılaştırıldığında konjugasyon biyofilmlerde daha etkili bir gen aktarım yolu olarak antibiyotik direncinin aktarılmasında önemli bir rol oynamaktadır (57).

Günümüzde biyofilmlerin üç boyutlu yapısı yeni görüntüleme teknikleri ve biyokimyasal yöntemlerle belirlenmiştir. Bunun yanında biyofilm hücrelerinin fizyolojisi, genotipik ve fenotipik varyasyonları araştırılmıştır. Biyofilm metabolomu, proteomu ve transkriptomunun daha derin bir şekilde anlaşılması da mümkün olmuştur. Biyofilm yapısını saptanmasında çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Doku kültürü plak yöntemi (mikroplak yöntemi), tüp yöntemi, Kongo kırmızısı agar yöntemi, bioluminesans inceleme, reflecting spektroskopisi, Piezo elektrik sensör yöntemleri bunlardan bazılarıdır (58). Mikroplaklarda biyofilm oluşumu en sık kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu yöntemin uygulama açısından kolay oluşu ve az miktarda ekipman ve sarf malzeme gerektirmesinin yanısıra bakterilerde biyofilm oluşumunun değerlendirilmesinde farklı uygulamaların kullanılabilmesi için uygun bir yöntem olduğu gösterilmiştir (59). Bu yöntemde bakteri hücreleri bir polistiren mikroplağın kuyucuklarında üretilmekte, farklı zaman aralıklarında kuyucuklar boşaltılmakta ve kuyucukların yüzeyine bağlı olan biyokütleyi boyamadan önce planktonik hücreleri uzaklaştırmak için yıkanmaktadır. Bunun dışında en sık kullanılan biyofilm saptama yöntemleri, biyofilm miktarının ölçümü sırasında kuyucukların dibine çöken diğer hücrelerin hatalı sonuçlara neden olmasını engellemek amacıyla geliştirilen Calgary biyofilm cihazı ve biyofilm gelişiminin erken aşamalarını araştırmak için kullanılan biyofilm halka testidir (60).

2.5 Klinik (KF ve *Burkholderia*)

Burkholderia türleri, en sık kistik fibrozisli hastalar olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi morbidite ve mortaliteye neden olabilmektedir. Kistik fibrozis dünya çapında 80.000 civarında insanı etkileyen en sık görülen ölümcül kalıtsal hastalıktır. Otozomal resesif olarak genetik geçiş gösteren bu hastalığın Kuzey Avrupa'daki taşıyıcı sıklığı 1/25 olup canlı doğan her 2000-3.500 bebeğin bir tanesinde görülmektedir (61). Ülkemizde insidansın 1/3.000 olduğu bildirilmektedir (62). Kistik fibrozis tüm vücuttaki egzokrin glandları etkileyen bir hastalık olmakla birlikte, pulmoner sistemde meydana gelen harabiyet hastalığın prognozunda önemli rol oynamaktadır. Bu hastalığın genetik nedeni 7 numaralı kromozom üzerinde bulunan CFTR –‘cystic fibrosis transmembrane conductance regulator’ geninde oluşabilecek 2.000'den fazla mutasyon nedeniyle (en sık $\Delta F508$) epitel hücrelerinin apikal membranında klor kanalı olarak görev yapan CFTR proteinin hatalı katlanması ve hücre membranına entegre olamamasıdır (63).

Hava yolu epitel hücreleri akciğerin mukosilier temizliğine ek olarak, salgıladığı antimikrobiyal maddeler sayesinde mikrobiyal enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattını oluşturur. Bronş epitelinin proinflamatuvar ve antimikrobiyal yanıtlarının düzenlenmesinde anahtar rol oynayan patojen tanıma reseptörleri, mikroorganizma varlığında sayılarını değiştirerek ve hücre içi sinyal yollarını aktive veya inhibe ederek etki göstermektedir (64). İn vitro ve in vivo çalışmalar, flagellin ile TLR5, PGN ile TLR2 veya lipopolisakkarit ile TLR4 etkileşimlerinin gen ifadesinde aşırı artışa bağlı olarak solunum yolu epitel hücrelerinde aşırı sitokin salınmasına (IL-8, IL-17A) sebep olduğunu, bu yüksek düzey proinflamatuvar yanıtın akciğer inflamasyonunu alevlendirebildiğini göstermiştir (65).

Kistik fibrozis hastalarının solunum yolları nötrofillerin yoğun bulunduğu ortamlardır. Nötrofiller enfeksiyon bölgesine IL-8 gibi kemokinler ve LTB4 gibi lipid mediyatörlerle göç ederler. Kistik fibrozis hastalarının solunum yollarındaki nötrofillerde saptanan yüksek TLR5 seviyesinin akciğer fonksiyonundaki kötüleşme ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (66).

Viskozitesi artmış sekresyonların trakeobronşiyal ağaç, pankreas, ter ve tükürük bezlerinde birikmesiyle kanallarda tıkanıklık ve buna bağlı inflamasyon

meydana gelmektedir. Solunum yolundaki viskoz mukoid salgı patojenlerin doğal yollarla uzaklaştırılmasını önleyerek, bu hastalarda sık tekrarlayan ve kalıcı olan enfeksiyonlara neden olmaktadır. Kronik obstruktif hastalık tablosuna eklenen enfeksiyonlar ilerleyen bronşektazi ve solunum yetmezliğine neden olarak kistik fibrozisli hastaların yaşam süresi ve kalitesinde belirgin kötüleşmeye yol açmaktadır. Bu hastalarda en sık izole edilen bakteriler *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* ve *Burkholderia* türleridir (67).

Burkholderia cepacia kompleks kistik fibrozisli hastalarda asemptomatik taşıyıcılıktan ölümcül pnömoniye kadar değişen klinik tablolara neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar, Bcc'nin kistik fibrozisli hastalarda çoğunlukla fırsatçı enfeksiyonlara neden olabildiğini, ancak septisemi ve fatal pnömoni ile seyreden 'cepacia sendrom' ile hayatı tehdit edebildiğini göstermiştir (68).

Bu türlerin aynı zamanda hastane salgınları, santral venöz kateter ilişkili enfeksiyonu, endoftalmit, nekrotizan fasiit, peritonit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve genitoüriner sistem enfeksiyonları oluşturduğu da gösterilmiştir (69). Kistik fibrozis hastalarında en sık görülen Bcc türlerini inceleyen epidemiyolojik çalışmalarda, hastalığa neden olan tür ve antibiyotik duyarlılıklarının farklı olduğu ve ülkelerarası farklılıklar da bulunduğu saptanmıştır (70). Bu nedenle, *Burkholderia* türlerinin tür düzeyinde doğru tanımlanması hasta yönetimi ve ulusal antimikrobiyal direnç sürveyansı açısından önem taşımaktadır.

2.6 Tanı

Burkholderia türlerinin fenotipik özelliklerinin benzerliğinden dolayı türler arası ayırım zordur. Rutin klinik laboratuvarlarda, Bcc olması muhtemel izolatların tanımlanması genellikle seçici besiyeri, geleneksel biyokimyasal analizler ve/veya ticari sistemlerin bir kombinasyonu kullanılarak yapılmaktadır.

Kistik fibrozis hastalarının balgamından Bcc türlerinin normal flora bakterilerinden ayrılabilmesi ve izolasyonu için çeşitli besiyerleri geliştirilmiştir. Bu besiyerlerinden *Pseudomonas cepacia* agar (PCA; 300 U/ml polimiksin B ve 100 mikrogram/ml tikarsilin içeren); laktoz ile desteklenmiş oksidasyon-fermantasyon agar (OFPBL; 300 µ/ml polimiksin B ve 0.2 U/ml basitrasin içeren); ve *B. cepacia*

selektif agar (BCSA ; %1'lik laktoz, %1 sükröz, zenginleştirilmiş kazein, maya ekstraktı, 600 U/ml polimiksin B, 10 µ/ml gentamisin ve 2.5 µ/ml vankomisin içeren) yaygın olarak kullanılmaktadır. Kistik fibrozisli hastaların solunum yolu örneklerinden Bcc'ye ait organizmaların izolasyonu ve diğer organizmaların inhibisyonu açısından değerlendirildiğinde; BCSA'nın OFPBL ve PCA'dan süre (72 saat inkübasyonun ardından %100 üreme) ve kalite (72 saat inkübasyondan sonra %70 iyi üreme) açısından üstün olduğu bildirilmiştir. Çevrede bulunan *B. cepacia*'nın izolasyonunda yukarıda bahsedilen besiyerlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü çok daha düşüktür, bu nedenle PCAT besiyeri (azelaik asit ve triptamin içeren) veya TB-T besiyeri (glukoz, asparajin, tripan mavisi ve tetrasiklin içeren) gibi diğer besiyerlerinin kullanımı önerilmektedir (71).

Burkholderia cepacia kompleksi içindeki türler fenotipik olarak benzerlik göstermektedir. Bu nedenle bu türlerin birbirinden ayrılması geniş bir biyokimyasal test paneli ile bile sorunludur. *Burkholderia cepacia* kompleksinin önemli biyokimyasal ve fenotipik özellikleri Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

Şekil 2.2 *Burkholderia cepacia* kompleksinin önemli biyokimyasal ve fenotipik özellikleri (11)

	Bam	Ban	Bar	Bcen	Bce	Bco	Bdi	Bdo	Blaa	Blae	Bme	Bmu	Bpy	Bse	Bst	Bubo	Bvi	Bgl
Oksidaz	+	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	V	+	+	+	+	V
MacConkey'de üreme	+	+	+	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+
Maltotdan asit üretimi	+	+	+	V	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Laktozdan asit üretimi	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	-
D-ksilozdan asit üretimi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	V	+
Sükrozdan asit üretimi	+	V	V	+	V	+	V	-	V	+	V	-	V	V	-	+	+	-
Adonitoldan asit üretimi	+	V	+	V	V	+	V	+	V	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Nitrat redüksiyonu	V	V	V	V	-	V	+	+	V	-	-	+	V	-	-	V	V	V
Lizin dekarboksilaz	+	V	V	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+	V	+	-	+	-
Ornitin dekarboksilaz	-	-	+	V	V	-	-	-	V	-	-	-	V	V	+	-	-	-
Eskülin hidrolaz	V	-	-	V	V	V	-	-	V	-	+	-	-	V	-	-	-	V
Jelatinaz	+	-	+	V	V	+	V	-	V	V	+	-	V	+	+	+	-	V

+, izolatların %90'ından fazlası pozitif ; -, izolatların %10'undan azı pozitif; v, izolatların %10-90'ı pozitif Bam *B. ambifaria*, Ban *B. anthina*, Bar *B. arboris*, Bcen *B. cenocepacia*, Bce *B. cepacia*, Bco *B. contaminans*, Bdi *B. diffusa*, Bdo *B. dolosa*, Blaa *B. lata*, Blae *B. latens*, Bme *B. metallica*, Bmu *B. multivorans*, Bpy *B. pyrrocinia*, Bse *B. seminalis*, Bst, *B. stabilis*, Bub *B. ubonensis*, Bvi *B. vietnamiensis*, Bgl *B. gladioli*

Burkholderia cepacia kompleksini yukarıda sayılan fenotipik testlerin yardımıyla *Burkholderia gladioli*, *Pandoraea* türleri, *Ralstonia pickettii*, *Achromobacter xylosoxidans* ve *Stenotrophomonas maltophilia*'dan ayırmak ve tür seviyesinde tanımlamak mümkün olmaktadır, ancak türler içinde meydana gelebilecek fenotipik varyasyon ve farklı metodlarla elde edilen sonuçlar arasındaki

farklardan dolayı, Bcc'nın sadece fenotipik analize dayanan tanımlanması yeterli olmayıp donanımlı bir referans laboratuvarı tarafından doğrulanması edilmesi önerilmektedir (72).

Burkholderia türlerinin rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan otomatize yöntemler ile tür düzeyinde tanımlanması yaygın olarak kullanılmaktadır. Mevcut kullanımda olan ticari test sistemlerinin Bcc izolatlarını yeterli duyarlılık ve özgüllükle tanımlamakta başarısız olduğu bildirilmektedir (73). Sıklıkla bu izolatların en sık *S. maltophilia* veya *Ralstonia* spp. olarak tanımlandığı gösterilmiştir. Her ne kadar bazı ticari test sistemlerinin pozitif prediktif değerleri nispeten yüksek olsa da, bu sistemlerin sonucuna göre Bcc ait olarak tanımlanan bakteri izolatlarının fenotipik testlerle manuel olarak doğrulanması önerilmektedir (74).

Burkholderia türlerini ayırt edebilmek amacıyla güvenilir, hızlı ve uygun maliyetli tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) bu ihtiyacı karşılayan en güncel teknolojilerden biridir. Bu yöntem test edilen her izolat için özgün olan peptid spektrumu meydana getiren kütle spektrometrisini kullanmaktadır ve elde edilen spektrum internal veritabanında analiz edilerek bakteri tanımlanmaktadır. Bu teknoloji son birkaç yıl içinde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarındaki geleneksel tanımlama sistemlerinin yerini hızla almış olsa da Bcc gibi çok sık saptanmayan mikroorganizmalar için mevcut veritabanlarında bulunan referans spektrumların yetersiz olmasına bağlı hatalı tanımlamaların olduğu bilinmektedir. Veritabanlarının sürekli güncellenmesiyle bu sorunun üstesinden gelinmeye çalışılsa da günümüzde spektrumu iyi tanımlanmış türlerin sayısı mikrobiyal çeşitliliğin küçük bir kısmını teşkil etmektedir. Ayrıca örnek hazırlama aşamasının uygulayıcıya göre değişkenlik göstermesi mikroorganizmadan proteinlerin ekstraksiyonunu etkilemekte ve sonuçta laboratuvar içi ve laboratuvarlar arasında yöntemin farklı duyarlılıklarda olmasına neden olmaktadır. Tekrarlanabilirliğin artması için standart uygulamaların geliştirilmesi gerekmektedir (75-77).

Moleküler tanı yöntemleri, klasik yöntemlere oranla daha seçici, daha güvenilir ve kısa zaman içerisinde sonuç verebilen yöntemlerdir. Ancak bu

yöntemlerin zahmetli ve yüksek maliyetli olması nedeniyle rutin klinik mikrobiyoloji tanı laboratuvarlarındaki kullanımları sınırlıdır. Mikroorganizmaları tür düzeyinde kesin tanımlamak amacıyla günümüze kadar birçok yöntem geliştirilmiştir. Tüm hücre protein elektroforezi, 16S rRNA geni bazlı analizler, *recA* geni bazlı analizler, multilokus sekans analizi, tüm genom dizi analizi, *fur* ve *hisA* gen dizisi analizi bu yöntemlerden bazıları olup, herbirinin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (78).

Bu yöntemler:

a) Tüm hücre protein elektroforezi: Bakteriyel tanımlamada tüm hücre protein elektroforezinin kullanılmasının gerekçesi, yakından ilişkili bakterilerin standart koşullarda ürettiğinde oldukça benzer bir protein içeriğine sahip olmalarıdır. Tüm hücre protein profillerinin DNA-DNA hibridizasyon deneyleri ile yapılan sayısal analiz sonuçlarının karşılaştırılmasıyla, bu yöntemlerin birçok bakteri türü için tür düzeyinde doğru tanımlanması için kullanılması önerilmiştir. Vandamme ve ark. (10) tüm hücre proteinlerinin SDS-PAGE'sinin Bcc üyelerinin belirlenmesi için uygun bir teknik olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, tüm hücre protein profili-temelli tanımlama sonuçlarının diğer yaklaşımların sonuçlarıyla karşılaştırılması, birkaç çelişki ortaya çıkarmış ve birkaç *Burkholderia* türlerini birbirinden ayırmada sorunlu olduğu bildirilmiştir (79).

b) Tüm hücre yağ asidi analizi: Tüm hücre yağ asidi analizinin yüksek otomasyon derecesi, göreceli olarak basit olması ve düşük maliyeti izolatların hızlı tanımlanmasında önemli bir yöntem haline getirmiştir. Ancak, hücresel yağ asidi metil ester analizi, *Burkholderia* suşlarının cins düzeyinde tanımlanmasında yararlı görünse de, Bcc'e ait türlerin tanımlanmasında sınırlıdır ve *B. gladioli*'yi ayırt edememektedir. Uzun yıllar, tüm hücre protein elektroforez analizinden sonra tanımlanamayan Bcc olmayan izolatlar için yaklaşık düzeyde bir tanımlama elde etmek için tüm hücre yağ asidi analizi kullanılmış, bu uygulama tanımlanamayan izolatların uygun maliyetle 16S rRNA analizlerinin yapılabilmesinin ardından terk edilmiştir (80).

c) 16S rRNA gen tabanlı analizler: *Burkholderia cepacia* kompleks referans suşlarının 16S rRNA gen dizileri bu yöntemle karşılaştırıldığında, yüksek benzerlik değerleri (tipik olarak %98'in üzerinde) gösterdiği ve Bcc türlerinin filogenetik olarak çok yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu türler ayrıca, 16S rRNA gen

dizilerinde %2'ye kadar türler arası çeşitlilik gösterdiği için, Bcc'in bu analizinin de güvenilir olmadığı saptanmıştır (81).

d) *recA* geni tabanlı analizler: Başlangıçta Bcc bakterileri için, *recA* restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi çalışmaları basit, hızlı, ucuz ve doğru tanımlama yaklaşımı olarak çok umut verici görünmekteydi. Daha sonra restriksiyon fragmanlarını ayırmak için kullanılan geleneksel agaroz elektroforezi, benzer restriksiyon modelleri arasında zayıf bir ayırım gücüne sahip olduğundan poliakrilamid jel elektroforezi ile değiştirilmiştir. Bu türlerin çoğunun multiple restriksiyon profillerini içermesi ve birçok türde restriksiyon profillerinde üstüste gelmesi nedeni ile bu yöntem de Bcc türlerini ayırmada yetersiz kalmıştır (82).

e) Multilokus sekans analizi (MLSA): Multilokus sekans analizi moleküler biyolojide yakın türlerin ayırımı için kullanılmakta olan birden çok lokusun dizilenmesi esaslı güncel bir moleküler sınıflandırma yöntemidir. Bu yöntemde 'housekeeping' genlerin internal bölgelerinde bulunan nükleotid dizileri analiz edilmektedir. Genellikle 6-10 'housekeeping' genin yaklaşık 450-500 bp'lik fragmanları dizilenmekte, herbir izolat için 'housekeeping' gen setlerindeki DNA dizi varyasyonlarını değerlendirerek izolatlara özgü allel profili ortaya çıkarılmaktadır. Belirlenen alelik profiller, multilokus sekans analizi veri bankasındaki (<http://www.mlst.net>) bilinen alellerle karşılaştırılmaktadır. Nükleotid farklılıklarının ayırım derecesi esas alınarak benzer izolatlar aynı tür olarak kabul edilmektedir. Moleküler epidemiyoloji için tasarlanan ve adlandırılan türler içindeki suşları tanımlamak için tasarlanmış (benzerlik ve farklılıklar genellikle allelik profillerdeki farklılıklar olarak ölçülür) spesifik bir yöntem olan multilokus sekans tiplendirilmesi (MLST) aksine, MLSA farklı tür ve cinsleri temsil eden suşlar arasındaki benzerlikleri ortaya çıkarmak için alellerin nükleotit sekanslarına dayanan filogenetik prosedürleri kullanmaktadır (83).

f) Tüm genom çalışmaları: Yeni nesil dizileme tekniklerinin hızlı gelişmesi ve maliyetinin düşmesi sayesinde bakterilerin tüm genomunun dizilenmesi popüler bir tanımlama aracı olmuştur. Bu yöntemle elde edilen genomik bilgiler ve karşılaştırmalı analizler sayesinde mikroorganizmaların patojenitesi, antibiyotik direnci, virülans faktörleri ve evrimsel ilişkisi yüksek doğrulukta ortaya çıkarılmaktadır. Ancak bu teknoloji dünyada ve ülkemizde oldukça yenidir. Bu

nedenle üretilen bilginin doğru biyoinformatik analizleri ve standartlaşmış değerlendirmesi konusunda zaman ve deneyime ihtiyaç bulunmaktadır (84).

g) Diğer yöntemler: Bcc bakterilerinin tanımlanması için genomik DNA'nın amplifiye edilmiş fragman uzunluğu analizi, *fur* ve *hisA* gen dizisi analizi gibi yöntemler kullanılmıştır. Bu tekniklerin Bcc bakterilerinin doğru tanımlanmasında yararlılıklarının daha kapsamlı değerlendirilmesi gerekmektedir (82).

2.7 Antibiyotik duyarlılık

Bir mikroorganizmanın agar veya broth dilüsyon testinde gözle görülür üremesini önleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu minimum inhibitor konsantrasyon (MİK) olarak tanımlanmaktadır. Bu MİK değerlerine göre bakterinin duyarlı, orta-duyarlı ve dirençli olarak yorumlanabilmesi için test edilen bakterinin türüne ait duyarlılık sınır değerlerinin bilinmesi gereklidir. Her bakteri antibiyotik çifti için bu sınır değerler ABD'de 'Clinical Laboratory Standards Institute '(CLSI) ve Avrupa'da 'European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing' (EUCAST) tarafından belirlenmektedir. Bu rehberler mikrobiyoloji uzmanına ve klinisyene hasta tedavisinde örnekten izole edilmiş ve tanımlanmış bakteriye karşı uygun antibiyotiğin belirlenmesi konusunda çok değerli bilgiler sağlamaktadır (85).

Günümüzde yaygın kullanılan ADT yöntemlerinde genellikle doğru sonuç elde edilebilmesine rağmen bu yöntemler zaman alıcı ve emek yoğundur. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarına gelen örneğin uygun besiyerlerine ekilmesinin ardından saf koloni olarak izole edilmesiyle başlayan iş akışı bu bakterinin öncelikle manuel veya otomatize biyokimyasal testlerle tanımlanması ve ardından yine bakteri türüne uygun antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanmasını içeren ve uzun bekleme sürelerine yol açan bir süreçtir. Klinik mikrobiyolojide yaygın olarak kullanılan antibiyotik duyarlılık yöntemleri:

a) Sıvı mikrodilüsyon yöntemi: Bu yöntemde 96 kuyucuklu mikropalak kuyucuklarında test edilen antibiyotiğin ikiye katlanan konsantrasyonu hazırlanmakta, birden fazla ilaç ve/veya bakteri tek bir plakta aynı anda test edilebilmekte ve sonuçlar çıplak gözle veya otomatize türbidimetrik sistemlerde değerlendirilebilmektedir. Agar besiyerinde saf olarak üretilen 1-2 bakteri kolonisi

sıvı besiyerinde süspanse edilmekte ve $\sim 5 \times 10^5$ CFU/ml son konsantrasyon olacak şekilde seyreltilmektedir. Bilinen konsantrasyonda antibiyotik ve besiyeri içeren kuyucuklara bakteri süspanسیونu dağıtılmaktadır. Üreme kontrolü olarak sadece besiyeri ve bakteri içeren kuyucuklar, sterilit kontrolü olarak da sadece besiyeri içeren kuyucuklar kullanılmaktadır. Test edilen bakteriye uygun ısı ve atmosferde 24 saat inkübe edilen mikrolaktaki üremenin oluşturduğu bulanıklık gözle veya optik yöntemlerle değerlendirilmekte, bakteri üremesi görülmeye ilk kuyucuktaki antibiyotiğin konsantrasyonu MİK olarak belirlenmektedir (86).

b) Agar dilüsyon yöntemi: Bu yöntemde test edilecek antibiyotik doğrudan agar ortamına eklenmektedir. Bakteriler daha sonra agar yüzeyine genellikle 5-8 mm çapında olacak şekilde (10^4 CFU/ml) inoküle edilmekte ve 16-20 saat veya daha uzun bir süre inkübe edilmektedir. Üreme gözlenmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonuna sahip agar plağı MİK olarak kabul edilmektedir (86).

c) Disk difüzyon yöntemi: Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde bakterinin sıvı besiyerinde hazırlanmış 0,5 McFarland süspanسیونundan pamuk uçlu çubuk kullanılarak alınan bakteri agar besiyerinin üzerine yayılmaktadır. Belirlenmiş antibiyotik konsantrasyonları emdirilmiş kağıt diskler besiyeri yüzeyine uygun aralıklarla yerleştirilmekte ve besiyerinin uygun atmosferde 16-24 saat inkübasyonun ardından disk çevresinde üreme zon çapı ölçülmektedir. Daha sonra referans rehberlerle karşılaştırılarak bakterinin test edilen antibiyotiklere karşı duyarlı, orta duyarlı veya dirençli olduğu saptanmaktadır (86).

d) Gradient difüzyon yöntemi (Etest®): Bu yöntem de yaygın olarak kullanılan antibiyotik duyarlılık testlerinden biridir. Test edilecek antibiyotiğin azalan konsantrasyonları şeklinde hazırlanmış şeritler, disk difüzyon yönteminde anlatıldığı gibi besiyerine ekilmiş bakteri plağı üzerine yerleştirilmektedir. Besiyerinin uygun atmosferde 24 saat inkübasyonun ardından şerit üzerindeki ölçek ile şerit çevresindeki inhibisyon bölgesinin kesiştiği değer MİK olarak belirlenmektedir (86).

e) Otomatik sistemler: Manuel sistemlerin emek yoğun olması, sonuçların elde edilmesi için uzun süre gerektirmesi ve yorumlamadaki belirsizlikler nedeniyle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında otomatik sistemlerin kullanımına yönelik

eğilimde belirgin bir artış görülmektedir. Otomatik sistemler kullanılarak yapılan antibiyogramlarda sonuçlar hassas optik cihazlarla okunduğu için manuel okumaya kıyasla daha standart ve daha kısa sürede elde edilmektedir. Şu anda piyasadaki mevcut sistemlerin manuel sistemlere göre daha az işgücü istemesi, daha kısa sürede sonuç verebiliyor olması, sonuçların otomatik yorumlanması ve laboratuvar bilgi sistemleriyle kolay entegrasyonu bu sistemlerin avantajları arasında sayılmaktadır (87). Günümüzde FDA tarafından ABD'de kullanım için onaylanan Vitek 2 System (bioMérieux Marcy l'Etoile, France), BD Phoenix Automated Microbiology System (BD Diagnostics, Sparks, MD), MicroScan WalkAway (Siemens, Sacramento, CA) hızlı (3. 5-16 saat) ve The Sensititre ARIS 2X (Thermo Fisher, Waltham, MA) olmak üzere dört adet otomatik cihaz bulunmaktadır. Bu cihazlar duyarlılık sonuçlarını yorumlamak ve atipik paternlere ve sıra dışı direnç fenotiplerine bağlı test sonuçlarını analiz etmek için 'uzman sistemler' adı verilen gelişmiş bilgisayar yazılımlarına sahiptir. Duyarlılık testi sonuçlarının klinisyene hızlı bildirilmesi uygun antimikrobiyal tedaviye zamanında geçilmesini, daha az ek laboratuvar istemiyle doğrudan maliyet tasarrufunu, daha az invaziv prosedür gereksinimini ve daha kısa hastanede yatışı sağlamaktadır (88). Minimal inhibitor konsantrasyonların optimal yorumlanması, ilacın farmakokinetiği ve çeşitli vücut bölgelerinde belirli bakterileri eradikasyondaki başarısı üzerine bilgi sahibi olmayı gerektirir. Bu nedenle sonuçları hekime raporu bildirirmeden önce çoğu bakteri cinsi için ilgili tüm antibiyotiklerin MİK değerlerini belirleyen güncel CLSI ve EUCAST rehberleri kullanılarak duyarlılık testi bulguları laboratuvar tarafından yorumlanmalıdır.

2.7.1 *Burkholderia* Türlerinde Önerilen Antibiyotik Duyarlılık Yöntemi ve Kullanılan Antibiyotikler

Yapılan çalışmalar, *Burkholderia* enfeksiyonların tedavi yanıtlarının türe bağımlı olduğunu vurgulamakta, *B. multivorans* ve *B. cenocepacia* 'nın neden olduğu enfeksiyonlarda daha yüksek bulaş oranları ve mortalite olduğunu göstermektedir (89). *Burkholderia* türleri aminoglikozidler, birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler, antipsödomonal penisilinler ve polimiksinler gibi antibiyotiklere içsel olarak dirençlidir (90). *Burkholderia* türleri için Clinical and Laboratory Standards Institute

(CLSI) trimetoprim-sülfametoksazol, minosiklin, meropenem ve seftazidim için disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon duyarlılık yöntemlerini standardize etmiş; kloramfenikol, levofloksasin ve tikarsilin-klavulanik asit için ise sadece sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibitör konsantrasyonun belirlenmesini önermiştir (91). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), spesifik MİK ve klinik sonuçlar arasında bir korelasyon olduğuna dair kanıtların az sayıda olması nedeniyle antibiyotik duyarlılık eşik noktası önermemiştir (92).

2.7.2 *Burkholderia* Türlerinde Sinerji Testleri

Kistik fibrozisli hastalarda, *Burkholderia* türleri ile gelişen enfeksiyonlara karşı kombine antibiyotik tedavisi yaygın kullanılmaktadır. Bu şekilde sinerjik aktivite sağlanarak antimikrobiyal spektrumun genişletilmesi, direncin ortaya çıkmasının önlenmesi ve ilaç toksisitesinin azaltılması amaçlanmaktadır. Ancak, hangi antibiyotik kombinasyonlarının etkili olduğunu belirlemeye yarayan sinerji testleri pratikte rutin olarak yapılmamakta ve antibiyotik kombinasyonları bazı kombinasyonların sinerjik olduğu bilgisine dayanarak ampirik olarak seçilmektedir. Bu yaklaşımın, *Burkholderia* türlerine karşı ampirik olarak seçilen antibiyotik kombinasyonlarının tür ve hasta bazında her zaman optimal sonuç vermediği bilinmektedir (93). Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro değerlendirilmesi için çok sayıda yöntem geliştirilmiş (dama tahtası– ‘checkerboard’ yöntemi, MCBT- ‘multiple combination bactericidal antimicrobial testing’, E-test® sinerji yöntemi ve zamanla ölüm eğrisi yöntemi- ‘time-kill curve assay’ vb.), ancak altın standart bir yöntem önerilmemiştir. Bu yöntemler arasında dilüsyon testi kistik fibrozisli hastalardan izole edilen bakterilere karşı kullanılan antibiyotiklerin sinerjik etkilerini değerlendirmek için en yaygın kullanılan testlerden biridir. Genellikle iki farklı antibiyotik sınıfına ait iki antimikrobiyal ajanın iki kat artış gösteren seri dilüsyonları test edilmektedir. Olası sinerjinin değerlendirilmesi için test edilen her antibiyotik için fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) hesaplanır. Bu değer, bir antibiyotığın test edilen kombinasyondaki MİK’inin antibiyotığın tek başına olan MİK’ine oranıdır. Her kombinasyon için antibiyotiklerin FİK’leri toplanır ve toplam FİK 0,5

ve altında ise sinerji, 4 ve üzerinde ise antagonizma, bu iki değerin arasında ise etkileşim yok olarak değerlendirilir (94).

2.7.3 *Burkholderia* Türlerinde Direnç Mekanizmaları

Burkholderia türlerinde antibiyotik direncinin en yaygın mekanizmaları olarak hücre duvar geçirgenliğinin azalması veya artan efluks aktivitesi nedeniyle antibiyotiğin hedefe erişimin önlenmesi, antibiyotik hedefinde mutasyon, ilacın enzimatik modifikasyonu veya inaktivasyonu sayılmaktadır (95).

a) Hücre duvarının azalmış geçirgenliği: Bakteri yüzeyinde bulunan LPS stres koşullarında şeker, fosfat veya açıl gruplarının eklenmesi veya çıkarılması gibi ilave değişikliklere uğrayarak bakteri sağkalımını sağlamaktadır. Lipopolisakkarit değişimleri arasında, 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz ilavesiyle fosfat gruplarının katyonik yer değişimi, lipid A'nın net negatif yükünü azaltmaktadır. *Burkholderia cenocepacia*, oligosakkarit bölgesinde oluşan değişikliklerle polimiksin B gibi antimikrobiyal peptitlere karşı direnç kazanmaktadır. Bu tür aynı zamanda çinko metaloproteazlar ve ADP-L-gliserol-D-manno-heptoz sentezinin duraklamasına bağlı lipopolisakkarit yapısının bozulmasına neden olmaktadır (96).

b) Antibiyotik modifikasyonu: Bu mekanizma, bakteriler tarafından β -laktamlara ve aminoglikozidlere karşı direnç elde etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemler gibi β -laktamlar, β -laktam halkasının hidrolizi yoluyla periplazmik β -laktamazlar tarafından inaktive edilmektedir. β -laktamlara direnç, sıklıkla AmpC (genişletilmiş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize eder), AmpD (bir hücre duvarı geri dönüşüm enzimi), PenA ve PenB (Bcc'de aşırı korunmuş olan bir A sınıfı penisilinaz) üretimi ile gerçekleştirilmektedir (97).

c) Efluks pompalarının aşırı ekspresyonu: *Burkholderia* türlerinde RND (resistance nodulation cell division) efluks pompaları aminoglikozid, kinolon, kloramfenikol ve tetrasiklin direncinde önemli bir rol oynamaktadır (98).

d) Antibiyotiğin hücresel hedefinde mutasyonlar: İlaç hedefinin modifikasyonu, *B. cenocepacia* için tanımlanan ana direnç mekanizması değildir. Klinik Bcc izolatlarında sınıf 1 integronunun (QRDR; topoizomera II ve IV'ün

kinolon direnci belirleyici bölgeleri) rollerini analiz eden bir çalışma levofloksasin direncinin, topoizomerazları kodlayan QRDR genlerinde ve eflüks pompası aktivasyonunda mutasyonların birikmesinden kaynaklandığını bildirmiştir (99).

2.8 Tedavi

Burkholderia cepacia kompleks türleri, diğer non-fermenter gram negatif bakterilere kıyasla daha fazla sayıda antibiyotiğe dirençli olduğu için dikkat çekmektedir. Kistik fibrozisli hastalarda birinci basamak tedavide trimetoprim-sülfametoksazol, seftazidim ve meropenem önerilmekte olup, ikinci basamak tedavide piperasilin-tazobaktam, tikarsilin-klavulonat, levofloksasin, minosiklin ve kloramfenikol kullanılabileceği bildirilmektedir. Kombinasyon tedavisi olarak bir ve ikinci basamakta bulunan iki veya daha fazla antimikrobiyalın tür ve duyarlılık paternlerine göre seçilmesi gerekmektedir (100).

Kistik fibrozisli hastaların tek ilaçla tedavisine trimetoprim-sülfametoksazol ile başlanması sıklıkla önerilmekle birlikte, tedavide bunu tek başına kullanılmasını öneren kaliteli yayın bulunmamaktadır. Tedavi önerileri retrospektif klinik çalışmalarda bildirilen duyarlılık profillerine ve olgu raporlarına dayanmaktadır (101). Avgeri ve ark. (102) tarafından yapılan bir meta-analiz çalışmasında 50'den fazla çalışma incelenmiş ve kistik fibrozisli hastalarda gelişen Bcc enfeksiyonlarının tedavisinde trimetoprim-sülfametoksazol yetersiz olduğunda seftazidim, meropenem ve piperasilinin tek başına veya diğer antibiyotiklerle kombine olarak kullanılmasının uygun olabileceği sonucuna varılmıştır.

Burkholderia cepacia kompleksi'ne bağlı enfeksiyonlarda pulmoner alevlenmelerin tedavisi için, en az iki antimikrobiyal ile 14-21 günlük parenteral tedavi, yoğun göğüs fizyoterapisi ve bronkodilatör uygulaması önerilmektedir. Etkenin duyarlı olduğu durumlarda meropenem (her 8 saatte bir kez 40 mg/kg) ve aşağıdakilerden bir veya iki ilacın eklenmesi uygun bir tedavi seçeneği olarak görülmektedir: tobramisin (günde bir kez 10 mg/kg) veya amikasin (günde bir kez 20 mg/kg); seftazidim (her 8 saatte bir kez 50 mg/kg) veya trimetoprim-sülfametoksazol (her 12 saatte bir kez 5 mg/kg trimetoprim) (103).

Burkholderia cepacia kompleks bakterilerinin tedavisi amacıyla yeni geliştirilen sadece birkaç tane antimikrobiyal bulunmaktadır. Bunlardan non- β -laktam β -laktamaz inhibitörü avibaktam, PenA tip β -laktamaza karşı kuvvetli bir aktiviteye sahiptir ve bu nedenle, seftazidim-avibaktam uygulaması, birinci basamak ajanların aktif olmadığı durumlarda bir seçenek olarak önerilmektedir (104). Diğer bir sefalosporin ve β -laktamaz inhibitörü kombinasyonu olan seftolozan-tazobaktam ise bazı Bcc türlerine karşı belirgin in vitro aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte, MİK aralığı geniştir (≤ 0.5 ve >64 $\mu\text{g/ml}$) ve klinik etkinliği değerlendiren bir çalışma henüz bulunmamaktadır (105).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Bakteri İzolatları:

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi'nde 2007-2017 yılları arasında kistik fibrozisli ve kistik fibrozis olmayan erişkin ve çocuk hastalardan izole edilen ve -80°C de stok edilen 127 bakteri çalışmaya alındı. Bu bakteriler arasında canlılığını koruyan bakteriler geleneksel mikrobiyolojik yöntemler ve MALDI-TOF MS ile tanımlandı ve 90 adetinin *Burkholderia* türü olduğu saptandı. Ayrıca aynı hastadan bir yıl içinde izole edilen aynı tür bakteriler çalışmadan çıkarıldı. Sonuç olarak çalışmada, toplam 38 *Burkholderia* türünün MLSA ile tanımlanması, tiplendirilmesi, biyofilm oluşumu, antibiyotik duyarlılık ve sinerji testleri değerlendirildi.

3.2 Bakteri İzolatlarının Rutin Yöntemlerle Tanımlanması

Stoktan (-80C) açılan bakteriler koyun kanlı agar besiyerine (RTA, İstanbul, Türkiye) iki defa pasajlandı. Bu bakterilere Gram boyama, ardından oksidaz, glukoz fermentasyonu, indol, katalaz ve hareket testleri yapıldı. Gram negatif, non-fermenter, hareketli, oksidaz ve katalaz pozitif, indol negatif olan bakteriler çalışmaya alındı.

Bu izolatların tür düzeyinde tanımlanması MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ile üretici firma önerileri doğrultusunda değerlendirildi. Tanımlamada tüm izolatlara üretici firma tarafından önerilen şekilde etanol-formik asit ekstraksiyon protokolü uygulandı. MALDI-TOF MS ile tanımlama için:

1. Kanlı agar besiyerinde saf üreyen 1-2 bakteri kolonisi 300 µl steril deiyonize su ile karıştırıldı.
2. Bakteri süspansiyonuna 900 µl etanol eklendi ve 10 sn vortekslendi.
3. 10,000 g'de 2 dk santrijüj edildi.
4. Süpernatant atıldı ve 10,000 g'de 2 dk santrijüj edildi.
5. Osa ısısında 5 dakika etanolün buharlaşması beklendi.

6. %70 formik asit solüsyonundan 50 µl eklendi.
7. Üzerine 50 µl asetonitril eklendi ve 5 sn vortekslendi.
8. 10,000 g'de 2 dk santrijüj edildi.
9. Süpernatandan 1 µl metal plak üzerindeki işaretli alana pipetle eklendi ve oda ısısında kurutuldu.
10. Üzerine 1 µl siyano-4-hidroksisinamik asit eklenerek oda ısısında kurumaya bırakıldı.
11. Metal plak, kütle spektrometri cihazına yerleştirildi ve örnek başına 320-400 vuruş olacak şekilde lazer ışınları ile atışlar yapıldı.

Spektrumlar Flex Control 3.0 yazılımı MALDI Biotyper 3.1 veritabanı kütüphanesi (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) kullanılarak analiz edildi. Üretici firma önerilerine göre tanımlama skoru $\leq 1,7$ olan sonuçlar geçersiz kabul edilirken, tanımlama skoru 1,7-1,99 arası cins düzeyinde iyi tanımlama ve tanımlama skoru ≥ 2 ise tür düzeyinde tanımlama olarak kabul edildi.

3.3 Bakteri İzolatlarının Multilokus Sekans Analizi ile Tanımlanması

3.3.1 DNA İzolasyonu

Her izolat nutrient agarda (Oxoid, ABD) saf olarak üretildi. Bir bakteri kolonisinden 200 µl DNase-RNase içermeyen su içinde süspansiyon hazırlandı. GeneJET Genomik DNA Pürifikasyon kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda Gram-negatif bakteri DNA'sı aşağıdaki ekstraksiyon protokolüne göre elde edildi:

1. Bakteri süspansiyonu içine 180 µl '*digestion*' solüsyonu eklendi.
2. 20 µl Proteinaz K solüsyonu eklendi ve bir dakika vortekslendi.
3. Enzim aktivasyonu için 56°C'de 60 dk inkübe edildi.
4. 20 µl RNase A solüsyonu eklendi ve bir dakika vortekslendi.
5. 10 dk oda ısısında inkübe edildi.
6. 200 µl lizis solüsyonu eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
7. 400 µl %50'lik etanol eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
8. Mevcut lizatın tamamı '*spin column*' tüpüne aktarıldı.

9. 6000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
10. Koleksiyon tüpü atıldı ve yeni koleksiyon tüpü yerleştirildi.
11. 500 µl '*wash buffer I*' solüsyonu eklendi ve 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
12. Koleksiyon tüpü atıldı ve yeni koleksiyon tüpü yerleştirildi.
13. 500 µl '*wash buffer II*' solüsyonundan eklendi
14. 12,000 g'de 3 dk santrifüj edildi.
15. Koleksiyon tüpü atıldı ve '*spin column*' kapaklı 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
16. 200 µl '*elution buffer*' eklendi ve 2 dk oda ısısında inkübe edildi.
17. 8000g'de 1 dk santrifüj edildi.
18. DNA'ların 260 ve 280 nm'deki absorpsiyon değerleri NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında ölçülerek DNA'ların konsantrasyon ve saflığı kontrol edildi. Uygun DNA örnekleri -20°C'de saklandı.

3.3.2 Multilokus Sekans Tiplendirmesi (MLST)

Burkholderia türlerinin '*housekeeping*' gen fragmanları olan ATP synthase beta chain (*atpD*), glutamate synthase large subunit (*gltB*), DNA gyrase subunit B (*gyrB*), recombinase A (*recA*), GTP binding protein (*lepA*), acetoacetyl-CoA reductase (*phaC*) ve tryptophan synthase subunit B (*trpB*) genleri PubMLST (<https://pubmlst.org/bcc>) veritabanında belirtilen *Burkholderia cepacia* kompleksi MLST analizi protokolü (Tablo 3.1) ve spesifik primerler (Tablo 3.2) kullanılarak ARKTIK Thermocycler cihazında (Thermo Fisher Scientific, ABD) çoğaltıldı (106). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) karışımı Tablo 3.3'e göre hazırlandı (106). PCR ürünleri elektroforez yöntemi ile analiz edildi (107).

Tablo 3.1 MLST PCR amplifikasyonu sıcaklık ve döngü koşulları

PCR basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	96°C	1 dk	-
Denatürasyon	96°C	1 dk	
Bağlanma	58°C	1 dk	30
Uzama	72°C	2 dk	
Son uzama	72°C	5 dk	-

Tablo 3.2 MLST PCR amplifikasyonunda kullanılan ‘housekeeping’ genler ve kullanılan primer dizileri

Gen	Yön	Primer Dizisi	Büyüklik (bp)
<i>atpD</i>	F	GATCGTACAGTGCATCGG	756
	R	ATCGTGCCGACCATGTAG	
<i>gltB</i>	F	CGCTCGAAGATCAAGCAG	652
	R	GGGAACACCTTCACGAAC	
<i>gyrB</i>	F	CGACAACCTCGATCGACGA	738
	R	GACAGCAGCTTGTCGTAG	
<i>recA</i>	F	GATAGCAAGAAGGGCTCC	975
	R	CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC	
<i>lepA</i>	F	CGACGGCAAGGTCTACAA	525
	R	AGCATGTGCGACCTTCACG	
<i>phaC</i>	F	CTCAGCGAATTGCGTACG	704
	R	CCGTTTCAGCGAGAAGTCG	
<i>trpB</i>	F	GATCTACCTGAAGCGCGA	787
	R	GTGTGCATGTCCTTGTCG	

Tablo 3.3 MLST PCR karışımı

Bileşen	Hacim
dH ₂ O	14,8 µl
PCR buffer	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
F primer (10 pmol)	1 µl
R primer (10 pmol)	1 µl
Taq DNA polimeraz	0,2 µl
DNA	2 µl

PCR ürünlerinin elektroforez yöntemi ile analizi:

1. 3 gr agaroz (Thomas Scientific, ABD) 200 ml Tris Borate EDTA içerisinde eritildi.
2. 14 µl Safe View (NBS Biologicals Ltd, İngiltere) boyası eklenerek %1,5'luk agaroz jel hazırlandı.
3. 20 x 25 cm'lik yatay jel elektroforez tablasına döküldü. Thermo Fisher Scientific A2-24D tarak (1.5 mm kalınlık, 6.5 mm genişlik, 7 µl hacim, 24 adet kuyucuk) kullanıldı.
4. Yürütme tamponu olarak 0,5 molar TBE (Thermo Fisher Scientific B52) bulunan Thermo Fisher Scientific Thermo Owl A2 large Gel System elektroforez ünitesine yerleştirildi.
5. Her bir örnekten 5 µl alınarak, 2µl 6x yükleme solüsyonu (Thermo Fisher Scientific, 6x Loading Dye ve GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (SM0321)) ile karıştırıldı.
6. Elde edilen karışımlar jele yüklendi ve 180 voltta 60 dk elektroforez yapıldı.
7. G Box UV transillüminatör cihazında (Syngene, ABD) jel görüntülendi
8. Amplikonlar -20°C'de saklandı.

Saflaştırma ve DNA Dizi Analizi

Amplifikasyon sonrasında üretici firma önerileri doğrultusunda 5 µl PCR ürünü için 2 µl ExoSAP-IT enzimi (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile 37°C'de 30 dk, 80°C'de 15 dk inkübasyon olmak üzere PCR ürünleri saflaştırıldı. Saflaştırılan bu ürünler, her bir gen için spesifik primerler olan PubMLST veritabanında belirtilen DNA dizileme primerleri ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak DNA dizi analizi ile çoğaltıldı (Tablo 3.4) (106). Tablo 3.5'te belirtilen oranlar dikkate alınarak PCR karışımı oluşturuldu (106). Tablo 3.6'da belirtilen koşullarda amplifikasyon gerçekleştirildi (106).

Tablo 3.4 DNA dizi analizinde kullanılan primer dizileri ve bağlanma sıcaklıkları

Gen	Yön	Primer Dizisi	Allel büyüklüğü (bp)
<i>atpD</i>	F	GTTTCATCTGGCCGTACAC	443
	R	AACTGACGCTCGAAGTCC	
<i>gltB</i>	F	CTTCTTCTTCGTCGCCGA	400
	R	TTGCCGACGTAGTCGTTG	
<i>gyrB</i>	F	ATCGTGATGACCGAGCTG	454
	R	CGTTGTAGCTGTCGTTCC	
<i>recA</i>	F	TGACCGCCGAGAAGAGCAA	393
	R	GACCGAGTCGATGACGAT	
<i>lepA</i>	F	GGCATCAAGGAACTGACG	397
	R	CTGCGGCATGTACAGGTT	
<i>phaC</i>	F	AGACGGCTTCAAGGTGGT	385
	R	ACACGGTGTTGACCGTCA	
<i>trpB</i>	F	CTGGGTCACGAACATGGA	301
	R	CCGAATGCGTCTCGATGA	

Tablo 3.5 DNA dizi analizi için gerçekleştirilen PCR reaksiyonu bileşen ve hacimleri

Bileşen	Hacim
dH ₂ O	2 µl
BigDye	2 µl
5xBuffer	2 µl
Primer (3.2 pmol)	2 µl
DNA	2 µl

Tablo 3.6 DNA dizi analizi PCR sıcaklık ve döngü koşulları

PCR basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	96 °C	1 dk	-
Denatürasyon	96 °C	10 sn	25
Bağlanma	50 °C	5 sn	
Uzama	60 °C	4 dk	

PCR ürünleri, üretici firma önerileri doğrultusunda 1 g Sephadex'in (Oxoid, ABD), 13 ml distile suda çözülmesiyle elde edilen çözeltiden her bir örnek için 750 µl çözelti kullanılarak yapılan jel filtrasyonu ile saflaştırıldı. Saflaştırılan ürünler, ABI 3500 Genetik Analyzer (Thermo Fisher Scientific, ABD) kapiller elektroforez dizi analizi cihazına yüklenerek genlerin DNA dizileri belirlendi (106).

Elde edilen forward ve reverse dizilerinin birleştirilmesi ve hizalamanın yapılması için CLC Main Workbench Qiagen v.7.7.3. (Qiagen, ABD) dizi analiz programı ile analiz edilerek PubMLST veritabanındaki referans dizilerle karşılaştırıldı. Her bir gen PubMLST veritabanındaki referans dizilerle karşılaştırıldı (108). Her gen için allel profili belirlendi ve elde edilen allellerin kombinasyonunun PubMLST veritabanı (01. Ağustos. 2018) ile karşılaştırılması sonucu izolatlar tür düzeyinde tanımlandı ve sekans tipleri belirlendi (108).

3.4 Mikroplak Yöntemi ile Biyofilm Üretiminin Değerlendirilmesi

Çalışmada izole edilen 38 *Burkholderia* türünün biyofilm oluşumu O'Toole ve ark. (109) tarafından tarif edilen kristal viyole mikroplak ölçüm yöntemi ile değerlendirildi.

Çalışma öncesinde *Burkholderia* türleri için optimal biyofilm oluşturma koşulları belirlendi. Bu amaçla glikoz, pepton, maya özütü, NaCl, inokulum miktarı, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresinin etkileri tarandı. Çalışmada şu değişkenler kullanıldı: Glikoz (0.1 ve 1 g/L), pepton (0.1 ve 2 g/L), maya özütü (0.5 ve 2.5 g/L), NaCl (8.6 ve 86 mM), pH (5.8 ve 7.2), inokulum miktarı (1×10^7 CFU/ml ve 5×10^7 CFU/ml), inkübasyon süresi (24 ve 72 saat) ve sıcaklık (30-37°C).

Burkholderia türlerinin en fazla biyofilm oluşumunun gözlemlendiği 0,5 g/L glukoz, 0,1 g/L pepton, 0,5 g/L maya özütü, 8,6 mM NaCl içeren (pH=7,2) besiyeri biyofilm üretiminin değerlendirilmesi amacıyla kullanıldı.

1. Luria-Bertani broth (LB) içinde bir gece inkübe edilen bakteriler yukarıda tarif edilen besiyeri içinde 0,5 OD 600 olacak şekilde süspanse edildi.

2. Bu süspansiyondan 20 µl alınarak 180 µl aynı besiyerini içeren 96 kuyucuklu U tabanlı mikropklara dağıtıldı. Deney koşulları her bakteri için altı kuyucuk kullanılarak tekrarlandı.
3. Mikropklar 37°C’de 48 saat aerobik koşullarda inkübe edildikten sonra tutunamayan hücrelerin uzaklaştırılması için iki defa su küvetine hafifçe daldırılarak yıkandı.
4. Her bir kuyucuğa 125 µL %0,1’lik kristal viyole boyası dağıtıldı.
5. Plaklar 10-15 dakika oda sıcaklığında inkübe edild’ ve fazla boyanın uzaklaştırılması için dört defa su küvetine hafifçe daldırılarak yıkandı.
6. Kristal viyolenin çözülmesi amacıyla her bir kuyucuğa 125 µL %33’lik asetik asit dağıtıldı.
7. Plaklar 10-15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve çözülen kristal viyole düz tabanlı mikropklara aktarıldı.
8. Absorbans değeri plak okuyucu kullanılarak 600 nm’de ölçüldü.
9. Optik dansitelerine (OD) göre suşlarda biyofilm oluşumu belirlendi.
10. OD (izolat) ≤ OD (negatif kontrol): Biyofilm oluşumu negatif; OD (negatif kontrol) ≤ OD (izolat) ≤ 2OD (negatif kontrol): zayıf biyofilm oluşumu; 2OD (negatif kontrol) ≤ OD (izolat) ≤ 4OD (negatif kontrol): orta düzey biyofilm oluşumu; 4OD (negatif kontrol) ≤ OD (izolat): kuvvetli biyofilm oluşumu olarak kabul edildi.

3.5 Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi:

Çalışmamızda güncel tedavide kullanılan antibiyotiklerin (meropenem, seftazidim, trimetoprim-sülfametoksazol ve levofloksasin) minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi (86, 91).

Bu amaçla ilk olarak trimetoprim (Sigma-Aldrich), sülfametoksazol (Sigma-Aldrich), seftazidim (Sigma-Aldrich), meropenem (Sigma-Aldrich) ve levofloksasin (Sigma-Aldrich) antibiyotiklerinin toz hallerinden CLSI’nın önerilerine göre stok solüsyonları ve sulandırımı hazırlandı (91).

Antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanması

1. Kullanılan antibiyotiklerin herbirinden 1 gr toz halinde tartıldı.
2. Tablo 3.7’de verilen antibiyotiğe uygun çözücü ve seyrelticiler kullanılarak 100 mg/ml stok solüsyonlar hazırlandı.
3. Hazırlanan stok solüsyonlar steril distile su içinde seyreltildi ve seftazidim 512 µg/ml, levofloksasin 128 µg/ml, meropenem 256 µg/ml, trimetoprim 2432 µg/ml, sülfametoksazol 128 µg/ml olacak şekilde son konsantrasyonları hazırlandı.
4. 2 ml trimetoprim ve 2 ml sülfametoksazol solüsyonu karıştırıldı ve 1216-64 µg/ml trimetoprim-sülfametoksazol elde edildi. Bundan sonra trimetoprim-sülfametoksazol tek antibiyotik olarak değerlendirildi.
5. *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanılarak antibiyotiklerin kalite kontrolü yapıldı.

Daha sonra bu antibiyotikler için MİK değerleri katyon ayarlı Mueller Hinton (KA-MHB) sıvı besiyeri (BD BBL Mueller Hinton II Broth, ABD) kullanılarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 96 kuyucuklu plak üzerinde belirlendi (86). Bu besiyeri 20-25 mg/l Ca⁺⁺ ve 10-12,5 mg/l Mg⁺⁺ içermektedir.

Tablo 3.7 Antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan çözücü ve seyrelticiler

Antibiyotik	Çözücü	Seyreltici
Seftazidim	%10’luk sodium karbonat solüsyonu	Su
Levofloksasin	0,1 mol/L NaOH solüsyonu	Su
Meropenem	Su	Su
Trimetoprim	0,05 mol/L HCl solüsyonu	Su
Sülfametoksazol	2,5 mol/L NaOH solüsyonu	Su

Kasyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyeri hazırlanması:

1. Üretici firma önerileri doğrultusunda 22 gr kasyon ayarlı Mueller Hinton toz halindeki besiyeri hassas terazide tartıldı ve 1000 ml distile su içine eklenerek homojen hale gelene kadar çalkalanarak karıştırıldı.
2. 15 dk 121°C'de otoklavda steril edildi.

Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması:

1. Kanlı agarda 35°C'de 18 saat inkübe edilen bakterilerden saf olarak izole edilen 3 - 5 koloni 2 ml KA-MHB içinde süspanse edildi.
2. Bu süspansiyon 0.5 McFarland bulanıklık olacak şekilde KA-MHB içinde seyreltilti.
3. 50 µl bakteri süspansiyonu 950 µl KA-MHB içinde tekrar seyreltilti ve 15 dakika içinde kullanıldı.

Sıvı mikrodilüsyon testi:

1. Bir adet steril U tabanlı 96 kuyucuklu mikropakta tek antibiyotik için dört izolat değerlendirildi. Her izolat iki defa test edildi. İzolat 1 için satır A, B; izolat 2 için satır C, D; izolat 3 için satır E, F ve izolat 4 için satır G, H kullanıldı.
2. Her satırdaki 1 - 10 arasındaki kuyucuklar antibiyotiği seyreltmek için kullanıldı.
3. Her satırdaki 11 numaralı kuyucuk bakteri ve besiyeri içeren üreme kontrol kuyucuğu, her satırdaki 12 numaralı kuyucuk besiyeri kontrolü olarak kullanıldı.
4. Mikroplağın her sırasındaki ilk kuyucuk hariç tüm kuyucuklarına 50 µl/kuyucuk olacak şekilde KA-MHB dağıtıldı.
5. İlk kuyucuklara test edilecek antibiyotikten 100 µl/kuyucuk olarak dağıtıldı.

6. Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth içinde antibiyotiklerin iki kat seri dilüsyonları yapıldı. Bu amaçla ilk kuyucuktan alınan 50 µl antibiyotik ikinci kuyucuğa aktarıldı.
7. İkinci kuyucukta mikropipet yardımıyla en az 10 defa pipetaj yapılarak antibiyotik homojen bir şekilde seyreltildi. İkinci kuyucuktan alınan 50 µl antibiyotik üçüncü kuyucuğa aktarıldı.
8. Bu işlem onuncu kuyucuğa kadar aynı şekilde tekrarlanarak çift kat seri dilüsyonları hazırlandı.
9. Onuncu kuyucuktan alınan 50 µl antibiyotik atıldı.
10. Her sırada yer alan 12 numaralı kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 10 µl bakteri süspansiyonu dağıtıldı.
11. Plakların kapakları kapatılarak 35°C'de 24 saat aerobik atmosferde inkübe edildi.
12. Sonuçlar CLSI önerilerine göre değerlendirildi. Orta duyarlı olarak belirlenen izolatlar değerlendirmeye dirençli olarak alındı.

3.6 Sinerji Testi ile Antibiyotik Kombinasyonlarının Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi:

Çalışmada kullanılan antibiyotik kombinasyonlarının sinerjik etkisi dama tahtası yöntemi ile çalışıldı (86). Bu yöntemde CLSI tarafından önerilen MİK değerlerinin direnç sınırı kullanılarak üç kat üstü dilüsyon (8 x MİK) ve dört kat altı dilüsyon (0.06 x MİK) kullanılarak iki farklı ilaç kombinasyonunun etkinliği, her bir izolat için 96 kuyucuklu mikropalak üzerinde test edildi (91).

Test edilecek antibiyotiğin seri dilüsyonlarının hazırlanması:

Bu amaçla makrodilüsyon yöntemi kullanıldı (86). Tüm antibiyotiklerin yüksek hacimde dilüsyon setleri hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyonlar steril distile su içinde seyreltildi ve seftazidim 512 µg/ml, levofloksasin 128 µg/ml, meropenem 256 µg/ml, trimetoprim 2432 µg/ml, sülfametoksazol 128 µg/ml olacak şekilde son konsantrasyonları hazırlandı. 2 ml trimetoprim ve 2 ml sülfametoksazol solüsyonu

karıştırıldı ve 1216-64 µg/ml trimetoprim-sülfametoksazol elde edildi. Bundan sonra trimetoprim-sulfamatoksazol tek antibiyotik olarak değerlendirildi.

1. Sekiz adet steril cam tüp yanyana dizilerek her tüpe 2 ml KA-MHB dağıtıldı.
2. İlk tüpe test edilecek antibiyotikten 2 ml dağıtıldı.
3. Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth içinde antibiyotiklerin iki kat seri dilüsyonları yapıldı. Bu amaçla ilk tüpten alınan 2 ml antibiyotik ikinci tüpe aktarıldı.
4. İkinci tüp 30 sn vortekslenerek antibiyotik homojen bir şekilde karıştırıldı. İkinci tüpten alınan 2 ml antibiyotik üçüncü tüpe aktarıldı.
5. Bu işlem sekizinci tüpe kadar aynı şekilde tekrarlanarak çift kat seri dilüsyonları hazırlandı.

Sinerji testi için mikrodilüsyon plaklarının hazırlanması

1. Bir adet steril 96 kuyucuklu mikropakta bir adet ikili antibiyotik kombinasyonu bir izolat için değerlendirildi.
2. İlk satırdaki 2-10 arası kuyucuklara (A2-A10) kombinasyonda kullanılacak antibiyotiklerden birine ait seri dilüsyona ait konsantrasyonları (100 µl/kuyucuk) dağıtıldı.
3. İlk satır hariç tüm satırların ilk kuyucukları (B1-H1) kombinasyonda kullanılacak antibiyotiklerden diğerinin seri dilüsyonuna ait konsantrasyonları (100 µl/kuyucuk) dağıtıldı.
4. İkinci satırdan itibaren tüm satırlardaki 2-10 arası kuyucuklara karşılık gelen kombinasyona ait konsantrasyondaki antibiyotiklerin her birinden 50 µl/kuyucuk dağıtıldı.
5. Her satırdaki 11 numaralı kuyucuk (A11-H11) 100 µl besiyeri ve bakteri içeren üreme kontrol kuyucuğudur.
6. Her satırdaki 12 numaralı kuyucukta (A12-H12) sadece 100 µl besiyeri bulunmaktaydı ve besiyerinin sterilitesi test edildi.
7. Her sırada yer alan onikinci kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 20 µl bakteri süspansiyonu dağıtıldı.

8. Plakların kapakları kapatılarak $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 20 saat aerobik atmosferde inkübasyondan sonra plaklar gözle değerlendirildi.
9. Plak üzerinde her iki ilacın MİK değerleri dama tahtası testi ile eş zamanlı olarak tekrar çalışılmıştır; elde edilen sonuçlar, ilk çalışılan MİK değerleri ile karşılaştırıldı ve sinerji testleri yorumlanırken eş zamanlı olarak çalışılan MİK değerleri kullanıldı.
10. Sonuçların değerlendirilmesinde kombinasyon plağındaki üreme olmayan tüm kuyucuklar taranarak, en düşük FİK (fraksiyonel inhibitör konsantrasyon) indeksinin hesaplandığı kuyucuk değerlendirmeye alındı.
11. $FİK = (\text{MİK A kombinasyon} / \text{MİK A}) + (\text{MİK B kombinasyon} / \text{MİK B})$ olarak hesaplandı. $FİK \leq 0,5$ sinerjistik etkileşim, $FİK > 4$ antagonistik etkileşim ve $0,5 < FİK \leq 4$ etkileşim yok olarak değerlendirildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Klinik izolatların biyofilm oluşumu ve antibiyotik direnci ile ilgili elde edilen bulgular türler arasında ve hasta grupları arasında ki-kare testi ile değerlendirildi. Analizlerde SPSS 16.1 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) kullanıldı ve $p \leq 0,05$ olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Burkholderia spp. olarak tanımlanan ve çalışmaya alınan 38 izolata MALDI-TOF MS ve multilokus sekans analizi, biyofilm oluşumu, antibiyotik duyarlılık ve sinerji testleri yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen bakterilerin 25'i KF, 13'ü KF olmayan hastalardan izole edilmiş olup, toplamda 26 farklı hastaya ait (13 KF, 13 KF olmayan) izolat değerlendirilmiştir. Kistik fibrozisli hastalardan elde edilen klinik örneklerin 23'ü balgam, 1'i kan ve 1'i derin trakeal aspirattır. Kistik fibrozis olmayan hastalardan elde edilen klinik örneklerin 5'i kan, 4'ü idrar, 1'i derin trakeal aspirat, 1'i balgam, 1'i püvy ve 1'i kateter ucundan alınmıştır (Tablo 4.1).

Çalışmaya dahil edilen klinik izolatlar içinde multilokus sekans analizine göre en fazla tanımlanan tür *B. cenocepacia* (n=16, %42)'dir. Bunu *B. contaminans* (n=11, %29) izlemiştir. Tanımlanan diğer türler sırasıyla *B. gladioli* (n=4, %11), *B. dolosa* (n=4, %11), *B. multivorans* (n=2, %5) ve *B. seminalis* (n=1, %2)'dir.

Multilokus sekans analizi sonuçlarına göre KF hastalarından izole edilen 13 *B. cenocepacia* izolatının iki hastaya ait altısının ST-839, üç hastaya ait dördünün ST-1392 ve bir hastaya ait üçünün ST-602 olduğu tespit edilmiştir. KF olmayan hastalardan izole edilen üç *B. cenocepacia* izolatının ikisi ST-602 ve biri ST-740 olarak bulunmuş olup farklı hastalardır. Dört farklı KF hastasından *B. contaminans* olarak tespit edilen altı izolatın tamamının sekans tipi ST-102 olarak saptanmıştır. KF olmayan hastalara ait beş *B. contaminans* izolatının dördü ST-482 ve biri ST-102 olarak tespit edilmiş olup, bunların tamamı farklı hastalardır. İki farklı KF hastasından izole edilmiş dört *B. gladioli* izolatından üçü ST-629 olup, bir hastaya aittir; diğeri mevcut veritabanındaki sekans tipleri ile eşleşmemiştir. Değerlendirilen iki *B. multivorans* izolatı aynı KF hastasına aittir ve sekans tipi ST-19 olarak saptanmıştır. *B. dolosa* izolatları KF olmayan dört farklı hastadan izole edilmiş olup tamamının sekans tipi ST-72 olarak bulunmuştur. *B. seminalis* ise KF olmayan bir hastaya ait olmakla beraber sekans tipi ile eşleşen izolat mevcut veritabanında bulunmamaktadır (Tablo 4.2).

Tablo 4.1 *Burkholderia* türlerinin yaş, cinsiyet ve örnek türlerine göre dağılımı

Hasta no	İzolat no	Yaş	Cin-siyet	Bölüm	Örnek Türü	MLSA /Sekans Tipi
1 [#]	1	16 yıl 9 ay	E	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. cenocepacia</i> / 1392
	2	17 yıl 11 ay	E	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. cenocepacia</i> / 1392
2 [#]	3	20 yıl	K	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. multivorans</i> / 19
	4	22 yıl	K	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. multivorans</i> / 19
3 [#]	5	24 yıl	K	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. contaminans</i> / 102
4 [#]	6	9 yıl 3 ay	K	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. cenocepacia</i> / 1392
5 [#]	7	19 yıl	E	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. cenocepacia</i> / 602
	8	20 yıl	E	İç hastalıkları	Kan	<i>B. cenocepacia</i> / 602
	9	20 yıl	E	İç hastalıkları	Derin Trakeal Aspirat	<i>B. cenocepacia</i> / 602
6 [#]	10	8 yıl 1 ay	E	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. cenocepacia</i> / 839
	11	10 yıl 8 ay	E	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. cenocepacia</i> / 839
	12	11 yıl 8 ay	E	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. cenocepacia</i> / 839
7 [#]	13	16 yıl 1 ay	E	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. contaminans</i> / 102
	14	17 yıl 10 ay	E	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. contaminans</i> / 102
8 [#]	15	5 yıl 9 ay	K	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. gladioli</i> / 629
	16	9 yıl 10 ay	K	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. gladioli</i> / 629
	17	10 yıl 11 ay	K	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. gladioli</i> / 629
9 [#]	18	4 yıl 4 ay	K	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. cenocepacia</i> / 1392
10 [#]	19	22 yıl	E	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. contaminans</i> / 102

Tablo 4.1 (Devamı) *Burkholderia* türlerinin yaş, cinsiyet ve örnek türlerine göre dağılımı

Hasta no	İzolat no	Yaş	Cin-siyet	Bölüm	Örnek Türü	MLSA /Sekans Tipi
11 [#]	20	25 yıl	E	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. cenocepacia</i> / 839
	21	26 yıl	E	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. cenocepacia</i> / 839
	22	27 yıl	E	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. cenocepacia</i> / 839
12 [#]	23	15 yıl 5 ay	K	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. gladioli</i> / Tip (-)
13 [#]	24	13 yıl 10 ay	K	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. contaminans</i> / 102
	25	15 yıl 1 ay	K	Çocuk Göğüs Hastalıkları	Balgam	<i>B. contaminans</i> / 102
14	26	79 yıl	E	Romatoloji	İdrar	<i>B. contaminans</i> / 482
15	27	58 yıl	E	Kalp Damar Cerrahi	Balgam	<i>B. contaminants</i> / 102
16	28	41 yıl	K	Enfeksiyon Hastalıkları	Kan	<i>B. dolosa</i> / 72
17	29	8 yıl 1 ay	E	Üroloji	İdrar	<i>B. contaminans</i> / 482
18	30	45 yıl	E	Enfeksiyon Hastalıkları	Kateter ucu	<i>B. cenocepacia</i> / 740
19	31	48 yıl	K	İç hastalıkları	Kan	<i>B. cenocepacia</i> / 602
20	32	30 yıl	E	Nöroloji	Kan	<i>B. cenocepacia</i> / 602
21	33	26 yıl	E	İç hastalıkları	Kan	<i>B. seminalis</i> / Tip (-)
22	34	62 yıl	E	Onkoloji	İdrar	<i>B. contaminans</i> / 482
23	35	64 yıl	K	İç hastalıkları	Kan	<i>B. dolosa</i> / 72
24	36	42 yıl	E	Üroloji	İdrar	<i>B. dolosa</i> / 72
25	37	67 yıl	K	Anesteziyoloji Yoğun Bakım	Derin Trakeal Aspirat	<i>B. dolosa</i> / 72
26	38	42 yıl	E	Ortopedi	Püy	<i>B. contaminans</i> / 482

Kistik fibrozisli hasta, E: Erkek; K: Kadın; Tip (-): Tiplendirilemedi

Tablo 4.2 KF ve KF olmayan hastalardan izole edilen *Burkholderia* türlerinin MLSA sonuçları

MLSA sonucu	KF (Sekans tipi)	KF olmayan (Sekans tipi)
<i>B. cenocepacia</i> (n=16)	6 (ST-839), 4 (ST-1392), 3 (ST-602)	2 (ST-602), 1 (ST-740)
<i>B. contaminans</i> (n=11)	6 (ST-102)	4 (ST-482), 1 (ST-102)
<i>B. gladioli</i> (n=4)	3(ST-629), 1 (ST-?)*	0
<i>B. dolosa</i> (n=4)	0	4 (ST-72)
<i>B. multivorans</i> (n=2)	2 (ST-19)	0
<i>B. seminalis</i> (n=1)	0	1(ST-?)*
Toplam (n=38)	25	13

* ST-? : İzolatların allelik profil sonuçları mevcut veritabanındaki sekans tipleri ile eşleşmemiştir

Multilokus sekans analizi sonuçları referans olarak kabul edildiğinde, MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde doğru tanımlama %66 olarak saptanmıştır. *Burkholderia cenocepacia* izolatlarının %94 (n=15/16)'ünün tür düzeyinde doğru tanımlandığı, bir izolatın ise *B. vietnamiensis* olarak hatalı tanımlandığı görülmüştür. MLSA ile *B. contaminans* olarak tespit edilen 11 izolatın yedi tanesi MALDI-TOF-MS ile *B. cepacia*, dört tanesi ise *B. cenocepacia* olarak tanımlanmış olup, bu tür için tür düzeyinde doğru tanımlama MALDI-TOF-MS ile yapılamamıştır. MALDI-TOF MS ile dört *B. gladioli* izolatının üçü tür düzeyinde doğru tanımlanmış olup bir izolat hatalı olarak *B. cenocepacia* olarak tanımlanmıştır. *B.dolosa*, *B.multivorans* ve *B. seminalis* izolatlarının tamamı tür düzeyinde doğru tanımlanmıştır. (Tablo 4.3)

Tablo 4.3 *Burkholderia* türlerinin MLSA sonuçlarının MALDI-TOF MS ile karşılaştırılması

MLSA sonucu	MALDI Biotyper v3.1 Tanımlama Skorları		
	≥ 2	1.999-1.7	<1.7
<i>B. cenocepacia</i> (n=16)	<i>B. cenocepacia</i> (n=13)	<i>B. cenocepacia</i> (n=2)	
<i>B. contaminans</i>* (n=11)	<i>B. vietnamiensis</i> (n=1)		
	<i>B. cepacia</i> (n=7)		
	<i>B. cenocepacia</i> (n=4)		
<i>B. gladioli</i> (n=4)	<i>B. gladioli</i> (n=1)	<i>B. gladioli</i> (n=2)	
	<i>B. cenocepacia</i> (n=1)		
<i>B. dolosa</i> (n=4)	<i>B. dolosa</i> (n=4)		
<i>B. multivorans</i> (n=2)	<i>B. multivorans</i> (n=2)		
<i>B. seminalis</i> (n=1)	<i>B. seminalis</i> (n=1)		

*Veritabanında bulunmamaktadır.

Klinik izolatların tamamı değerlendirildiğinde; biyofilm üretimi izolatların %53 (n=20/38)'ünde pozitif saptanmıştır. *Burkholderia* türleri arasında biyofilm pozitifliği *B. cenocepacia* %75 (n=10/16), *B. contaminans* %63 (n=7/11) ve *B. multivorans* %100 (n=2/2) olarak tespit edilmiştir. *Burkholderia dolosa* ve *B. seminalis* izolatlarının tamamı ve *B. gladioli* izolatlarının %75 (n=3/4)'i biyofilm oluşturma açısından negatif bulunmuştur. *Burkholderia* türleri arasında biyofilm oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p \geq 0,05$, Tablo 4.4).

Tablo 4.4 *Burkholderia* türlerinin biyofilm oluşumu

Bakteri	Biyofilm oluşumu		
	Negatif	Zayıf	Orta
<i>B. cenocepacia</i> (n=16)	6	4	6
<i>B. contaminans</i> (n=11)	4	2	5
<i>B. gladioli</i> (n=4)	3	1	-
<i>B. dolosa</i> (n=4)	4	-	-
<i>B. multivorans</i> (n=2)	-	2	-
<i>B. seminalis</i> (n=1)	1	-	-
Toplam (n=38) (%)	18 (%47)	9 (%24)	11 (%29)

İzolatların biyofilm oluşturma özelliği ile kistik fibrozis ilişkisine bakıldığında, kistik fibrozisli (%56, 14/25) ve kistik fibrozisi olmayan (%46, 6/13) hastalardan elde edilen izolatlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p \geq 0,05$, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6).

Tablo 4.5 KF ve KF olmayan hastalardan izole edilen *Burkholderia* türlerinin biyofilm oluşumu

Hasta	Biyofilm oluşumu		
	Negatif	Zayıf	Orta
KF (n=25)	11 (%44)	7 (%28)	7 (%28)
KF olmayan (n=13)	7 (%54)	2 (%15)	4 (%31)

Tablo 4.6 *Burkholderia* türlerinin MALDI-TOF, MLSA ve biyofilm sonuçları

Hasta no	İzolat no	MALDI-TOF MS (Tanımlama Skoru)	MLSA /Sekans Tipi	BİYO FİLM
1 #	1	<i>B. cenocepacia</i> (2.227)	<i>B. cenocepacia</i> / 1392	-
	2	<i>B. cenocepacia</i> (2.199)	<i>B. cenocepacia</i> / 1392	-
2 #	3	<i>B. multivorans</i> (2.317)	<i>B. multivorans</i> / 19	1 +
	4	<i>B. multivorans</i> (2.297)	<i>B. multivorans</i> / 19	1 +
3 #	5	<i>B. cepacia</i> (2.120)	<i>B. contaminans</i> / 102	-
4 #	6	<i>B. vietnamensis</i> (2.093)	<i>B. cenocepacia</i> / 1392	-
5 #	7	<i>B. cenocepacia</i> (2.315)	<i>B. cenocepacia</i> / 602	2 +
	8	<i>B. cenocepacia</i> (2.097)	<i>B. cenocepacia</i> / 602	1 +
	9	<i>B. cenocepacia</i> (1.993)	<i>B. cenocepacia</i> / 602	-
6 #	10	<i>B. cenocepacia</i> (2.209)	<i>B. cenocepacia</i> / 839	1 +
	11	<i>B. cenocepacia</i> (2.189)	<i>B. cenocepacia</i> / 839	1 +
	12	<i>B. cenocepacia</i> (2.124)	<i>B. cenocepacia</i> / 839	-
7 #	13	<i>B. cepacia</i> (2.200)	<i>B. contaminans</i> / 102	2 +
	14	<i>B. cepacia</i> (2.167)	<i>B. contaminans</i> / 102	2 +
8 #	15	<i>B. gladioli</i> (2.239)	<i>B. gladioli</i> / 629	-
	16	<i>B. gladioli</i> (2.196)	<i>B. gladioli</i> / 629	1 +
	17	<i>B. gladioli</i> (2.281)	<i>B. gladioli</i> / 629	-
9 #	18	<i>B. cenocepacia</i> (2.202)	<i>B. cenocepacia</i> / 1392	-
10 #	19	<i>B. cepacia</i> (2.071)	<i>B. contaminans</i> / 102	-
11 #	20	<i>B. cenocepacia</i> (2.085)	<i>B. cenocepacia</i> / 839	1 +
	21	<i>B. cenocepacia</i> (2.380)	<i>B. cenocepacia</i> / 839	2 +
	22	<i>B. cenocepacia</i> (2.196)	<i>B. cenocepacia</i> / 839	2 +
12 #	23	<i>B. cenocepacia</i> (2.024)	<i>B. gladioli</i> / Tip (-)	-
13 #	24	<i>B. cenocepacia</i> (2.247)	<i>B. contaminans</i> / 102	2 +
	25	<i>B. cenocepacia</i> (2.218)	<i>B. contaminans</i> / 102	2 +
14	26	<i>B. cepacia</i> (2.142)	<i>B. contaminans</i> / 482	1 +
15	27	<i>B. cenocepacia</i> (1.971)	<i>B. contaminants</i> / 102	-
16	28	<i>B. dolosa</i> (2.078)	<i>B. dolosa</i> / 72	-
17	29	<i>B. cepacia</i> (2.338)	<i>B. contaminans</i> / 482	1 +
18	30	<i>B. cenocepacia</i> (2.305)	<i>B. cenocepacia</i> / 740	2 +
19	31	<i>B. cenocepacia</i> (2.398)	<i>B. cenocepacia</i> / 602	2 +
20	32	<i>B. cenocepacia</i> (2.267)	<i>B. cenocepacia</i> / 602	2 +
21	33	<i>B. seminalis</i> (2.198)	<i>B. seminalis</i> / Tip (-)	-
22	34	<i>B. cenocepacia</i> (1.785)	<i>B. contaminans</i> / 482	-
23	35	<i>B. dolosa</i> (2.162)	<i>B. dolosa</i> / 72	-
24	36	<i>B. dolosa</i> (2.192)	<i>B. dolosa</i> / 72	-
25	37	<i>B. dolosa</i> (2.273)	<i>B. dolosa</i> / 72	-
26	38	<i>B. cepacia</i> (2.255)	<i>B. contaminans</i> / 482	2 +
# : Kistik fibrozisli hasta; 1+: Zayıf biyofilm oluşumu ; 2 +: Orta düzey biyofilm oluşumu; - :Negatif; Tip (-): Tiplendirilemedi				

Tüm izolatların seftazidim, meropenem, TMP-SXT ve levofloksasin MİK değerlerine göre direnç düzeyleri sırasıyla %34, %66, %50 ve %40 olarak belirlenmiştir. *B. multivorans* ve *B. seminalis* izolatlarının tamamı, değerlendirilen tüm antibiyotiklere duyarlı bulunurken, *B. dolosa* izolatlarının tamamı dirençli saptanmıştır. *B. cenocepacia* izolatlarının seftazidim, meropenem, TMP-SXT ve levofloksasin antibiyotiklerine direnci sırasıyla %12, %62, %44 ve %37 olarak saptanmış olup, *B. contaminans* izolatlarının bu antibiyotiklere direncinin sırasıyla %54, %91, %36 ve %36 olduğu tespit edilmiştir. İzolatların antibiyotik direnci türler arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0,05$) (Tablo 4.7).

Tablo 4. 7 *Burkholderia* türlerinin antibiyotik duyarlılıkları

Bakteri	n	Seftazidim		Meropenem		TMP-SXT		LEV	
		S	R	S	R	S	R	S	R
<i>B. cenocepacia</i>	16	14	2	6	10	9	7	10	6
<i>B. contaminans</i>	11	5	6	1	10	7	4	7	4
<i>B. gladioli</i>	4	3	1	3	1	-	4	3	1
<i>B. dolosa</i>	4	-	4	-	4	-	4	-	4
<i>B. multivorans</i>	2	2	-	2	-	2	-	2	-
<i>B. seminalis</i>	1	1	-	1	-	1	-	1	-
Toplam n/Yüzde	38	25/ %66	13/ %34	13/ %34	25/ %66	19/ %50	19/ %50	23/ %60	15/ %40

TMP-SXT Trimetoprim-sülfametoksazol; LEV: Levofloksasin S: Duyarlı R: Dirençli

Kistik fibrozisli ve KF olmayan hastalar arasında izolatların antibiyotik direnci karşılaştırıldığında, seftazidim KF hastalarında daha duyarlı saptanmış ($p = .010449$), diğer antibiyotikler için KF ve KF olmayan hastalar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$, Tablo 4.8).

Çalışılan klinik izolatların sinerji sonuçları değerlendirildiğinde; iki tanesinde (*B. cenocepacia*, *B. contaminans*) meropenem ve TMP-SXT arasında sinerji saptanmıştır. Antibiyotiklerin ikili kullanımı ile ortaya çıkabilecek antagonizma 15 klinik izolatta saptanmış, bunların 12 tanesi meropenem ve seftazidim arasında, üç tanesi TMP-SXT ve seftazidim arasında bulunmuştur. Meropenem ve seftazidim kombinasyonunda antagonizma gösteren izolatlar *B. cenocepacia* (%66, 8/12), *B.*

contaminans (%17, 2/12) ve *B. multivorans* (%17, 2/12) olarak saptanmıştır. TMP-SXT ve seftazidim kombinasyonuna antagonizma ise iki *B. contaminans* ve bir *B. seminalis* izolatında belirlenmiştir (Tablo 4.9 ve Tablo 4.10).

Tablo 4.8 KF ve KF olmayan hastalardan izole edilen *Burkholderia* türlerinin antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik		KF(n:25)		KF olmayan(n:13)	
		n	%	n	%
Seftazidim	S	20	80	5	38
	R	5	20	8	62
Meropenem	S	10	40	3	23
	R	15	60	10	77
TMP-SXT	S	15	60	4	31
	R	10	40	9	69
Levofloksasin	S	17	68	6	46
	R	8	32	7	54
TMP-SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol; S: Duyarlı R: Dirençli					

Tablo 4.9 *Burkholderia* türlerinin sinerji testi sonuçları

Sinerji sonucu	Bakteri (n)
Sinerji (TMP-SXT- Meropenem)	<i>B. contaminans</i> (1) <i>B. cenocepacia</i> (1)
Antagonizma (Meropenem-Seftazidim)	<i>B. cenocepacia</i> (8) <i>B. contaminans</i> (2) <i>B. multivorans</i> (2)
Antagonizma (TMP-SXT-Seftazidim)	<i>B. contaminans</i> (2) <i>B. seminalis</i> (1)
Etkileşim yok	<i>B. cenocepacia</i> (7) <i>B. contaminans</i> (6) <i>B. dolosa</i> (4) <i>B. gladioli</i> (4)

Tablo 4.10 Burkholderia türlerinin antibiyotik duyarlılık ve sinerji testi sonuçları

Hasta no	İzolasyon no	TMP-SXT		MEM		CAZ		LEV		SİNERJİ
		MİK	Yorum	MİK	Yorum	MİK	Yorum	MİK	Yorum	
1 [#]	1	4.75/0.25	S	2	S	4	S	2	S	ETKİLEŞİM YOK
	2	4.75/0.25	S	2	S	2	S	1	S	ETKİLEŞİM YOK
2 [#]	3	19/1	S	1	S	2	S	0.25	S	ANTAGONİZMA (MEM-CAZ)
	4	38/2	S	2	S	2	S	0.5	S	ANTAGONİZMA (MEM-CAZ)
3 [#]	5	2.38/0.12	S	8	I	4	S	2	S	ANTAGONİZMA (MEM-CAZ)
4 [#]	6	608/32	R	8	I	8	S	32	R	ANTAGONİZMA (MEM-CAZ)
5 [#]	7	608/32	R	4	S	8	S	8	R	ETKİLEŞİM YOK
	8	608/32	R	64	R	8	S	32	R	ETKİLEŞİM YOK
	9	304/16	R	64	R	4	S	32	R	ETKİLEŞİM YOK
6 [#]	10	9.5/ 0.5	S	8	I	8	S	2	S	ANTAGONİZMA (MEM-CAZ)
	11	4.75/0.25	S	4	S	4	S	2	S	ANTAGONİZMA (MEM-CAZ)
	12	4.75/0.25	S	16	R	16	I	2	S	ANTAGONİZMA (MEM-CAZ)
7 [#]	13	76/4	R	16	R	128	R	2	S	ETKİLEŞİM YOK
	14	38/2	S	16	R	128	R	2	S	ETKİLEŞİM YOK
8 [#]	15	76/4	R	0.5	S	8	S	0.12	S	ETKİLEŞİM YOK
	16	152/8	R	1	S	8	S	0.25	S	ETKİLEŞİM YOK
	17	76/4	R	1	S	8	S	0.25	S	ETKİLEŞİM YOK
9 [#]	18	608/32	R	8	I	8	S	2	S	ANTAGONİZMA (MEM-CAZ)
10 [#]	19	19/1	S	8	I	8	S	4	I	ANTAGONİZMA (MEM- CAZ)
11 [#]	20	9.5/ 0.5	S	8	I	4	S	2	S	ANTAGONİZMA (MEM-CAZ)
	21	9.5/ 0.5	S	8	I	4	S	2	S	ANTAGONİZMA (MEM-CAZ)
	22	9.5/ 0.5	S	16	R	4	S	2	S	ANTAGONİZMA (MEM-CAZ)

Tablo 4.10 (Devamı) *Burkholderia* türlerinin antibiyotik duyarlılık ve sinerji testi sonuçları

Hasta no	İzolasyon no	TMP-SXT		MEM		CAZ		LEV		SİNERJİ
		MİK Yorum		MİK Yorum		MİK Yorum		MİK Yorum		
12 [#]	23	76/4	R	64	R	128	R	8	R	ETKİLEŞİM YOK
13 [#]	24	19/1	S	4	S	4	S	32	R	ANTAGONİZMA (TMP-SXT-CAZ)
	25	19/1	S	32	R	128	R	32	R	ANTAGONİZMA (TMP-SXT-CAZ)
14	26	608/32	R	8	I	8	S	0.5	S	ETKİLEŞİM YOK
15	27	19/1	S	8	I	64	R	0.5	S	ETKİLEŞİM YOK
16	28	608/32	R	16	R	128	R	32	R	ETKİLEŞİM YOK
17	29	608/32	R	8	I	8	S	0.5	S	SİNERJİ (TMP-SXT-MEM)
18	30	19/1	S	1	S	32	R	0.25	S	ETKİLEŞİM YOK
19	31	608/32	R	4	S	4	S	16	R	ETKİLEŞİM YOK
20	32	608/32	R	8	I	4	S	8	R	SİNERJİ (TMP-SXT-MEM)
21	33	19/1	S	2	S	8	S	0.25	S	ANTAGONİZMA (TMP-SXT-CAZ)
22	34	19/1	S	32	R	16	I	0.12	S	ETKİLEŞİM YOK
23	35	608/32	R	16	R	128	R	32	R	ETKİLEŞİM YOK
24	36	608/32	R	16	R	128	R	32	R	ETKİLEŞİM YOK
25	37	608/32	R	16	R	128	R	16	R	ETKİLEŞİM YOK
26	38	608/32	R	32	R	128	R	32	R	ETKİLEŞİM YOK

Kistik fibrozisli hasta; MİK:Minimal İnhibitör Konsantrasyon; TMP-SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol; CAZ:Seftazidim; MEM:Meropenem; LEV: Levofloksasin; S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Dirençli

Çalışmada değerlendirilen tüm klinik izolatların antibiyotik dirençleri biyofilm oluşumu ile ilişkisi değerlendirildiğinde; meropenem dirençli 25 izolatın 12'sinin, TMP-SXT dirençli 19 izolattan 9'unun biyofilm oluşturduğu saptanmıştır (Tablo 4.11). İzolatların biyofilm oluşturma özelliği ile antibiyotik direnci ilişkisine bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p \geq 0,05$).

Tablo 4.11 Dirençli *Burkholderia* türlerinin biyofilm oluşumu

Antibiyotik direnci	Biyofilm oluşumu					
	Pozitif		Negatif		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Meropenem	12	31	13	34	25	65
TMP-SXT	9	24	10	26	19	50
Levofloksasin	7	18	8	21	19	50
Seftazidim	5	13	8	21	13	34

TMP-SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol

5. TARTIŞMA

Mikroorganizmanın tür düzeyinde doğru tanımlanması tedavinin doğru planlanmasında ilk adımdır. Yapılan tek veya çok merkezli çalışmalarda, tedaviye yanıtızsız kistik fibrozis hastalarının Bcc türleri ile enfekte olduğu ve özellikle *B. cenocepacia*'nın diğer türlere kıyasla daha yüksek mortaliteye sahip olduğu gösterilmiştir (110). Bununla birlikte, *B. dolosa* ve *B. multivorans* gibi diğer türlerin de ciddi enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Bazı merkezlerde Bcc ile enfekte hastaların (özellikle *B. cenocepacia*) akciğer nakil listesine kabul edilmemesine yönelik uygulamalar, bu bakterilerin tür düzeyinde doğru tanımlamanın hasta açısından hayati önemi olduğunu göstermiştir (111).

Geleneksel fenotipik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak tür düzeyinde tanımlama yapmak her zaman kesin sonuç vermemektedir. Bunun nedeni olarak, *Burkholderia* türlerinin fenotipik özelliklerinin çok benzer olması gösterilmektedir. Bazı klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *Burkholderia* türlerinin tanımlanması otomatize sistemler ile de yapılabilmektedir. Yapılan bir çalışmada kistik fibrozis hastalarının solunum örneklerinden izole edilen organizmaların tanımlanmasında bu sistemler kullanıldığında Bcc üyelerine, *B. gladioli*, *R. pickettii*, *Alcaligenes* spp., *Pseudomonas* spp., *S. maltophilia*, *Flavobacterium* spp. ve *Chryseobacterium* spp. gibi tanımlamalar yapıldığı bildirilmiştir (112). Bu nedenle otomatize tanımlama sistemlerinin hatalı sonuçlar verebildiği, bu sonuçların doğrulanması gerektiği vurgulanmaktadır.

Burkholderia cepacia benzeri organizmaların tanımlanmasında kullanılacak sistemlerin, bu grup bakterileri diğer gram negatif nonfermenter bakterilerden kesin ayırt edebilmesi, Bcc'yı tür düzeyinde doğru tanımlayabilmesi ve ayrıca hızlı, uygun maliyetli ve kolay olması gerekmektedir. Günümüzde bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında geleneksel yöntemlerle birlikte, MALDI-TOF MS kullanımı yaygındır. Yapılan çalışmalarda MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde yapılan tanımlamaların %77-100 oranında doğru sonuç verdiği bildirilmektedir (113). Bizim çalışmamızda tür düzeyinde doğru tanımlama %66 olarak saptanmış olup, değerlendirilen türlerden *B. cenocepacia*, *B. dolosa*, *B. multivorans* ve *B. seminalis*

için MALDI-TOF MS sonuçları MLSA ile %94-100 uyumlu olmasına rağmen, *B. contaminans* izolatlarının tamamı (n=11/38, %29) tür düzeyinde hatalı tanımlanmıştır. Bu izolatların tanımlama skoru ≥ 2 olmasına rağmen tür düzeyinde doğru tanımlanamamış olmasının nedeni, çalışmanın yapıldığı tarihte kullanılan yazılımın veritabanı kütüphanesinde *B. contaminans*'ın bulunmaması, elde edilen spektrumun analizi ile uyumlu en yakın türün sonuç olarak değerlendirilmesi ile açıklanabilir.

Yapılan çalışmalarda, MALDI-TOF MS ile Bcc'nin %100'ünün cins düzeyinde, %77'sinin tür düzeyinde doğru tanımlanabildiği bildirilmiştir. Tür düzeyinde tanımlama duyarlılığının düşük olmasının nedeni taksonomik sınıflamaya yeni dahil olan Bcc türlerinin tamamının ve *Burkholderia cepacia* izolatlarının %33'ünün yanlış tanımlanması olarak bildirilmektedir (113). İngiltere'de 2017 yılında 1047 izolat ile yapılan bir çalışmada *B. multivorans*, *B. cenocepacia* ve *B. vietnamiensis* izolatlarının MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde tanımlama yüzdesi sırasıyla %89, %88 ve %86 bulunmuş olup, bu çalışmada en düşük düzeyde doğru tanımlanan tür %72 ile *B. cepacia* olmuştur. Bu çalışmada dikkat çekici bir veri ise henüz veritabanında olmayan iki *B. territorii* izolatının 2.3 ve üstü skorla *B. cenocepacia* olarak tanımlanması olmuştur (114). Benzer durum bizim çalışmamızda da *B. contaminans* için görülmüş olup MALDI-TOF MS ile 2 ve üzeri tanımlama skoruna sahip olan yedi izolat *B. cepacia*, iki izolat ise *B. cenocepacia* olarak hatalı tanımlanmıştır. *Burkholderia* türlerini MALDI-TOF MS ile tanımlarken yüksek tanımlama skorlarına rağmen bunların veritabanında henüz bulunmayan izolatlar olabileceği akılda tutulması, özellikle akciğer nakli ihtimali olan hastalarda bazı *Burkholderia* türlerinin üremesi durumunda hastanın nakil listesine kabul edilmeme ihtimali düşünülerek izolatın moleküler bir yöntemle doğrulanması gerekmektedir. Ayrıca aynı hastaya ait örnekte veya farklı zamanlarda çalışılmış örneklerde, farklı *Burkholderia* türlerinin tanımlanması da hatalı tanımlama olabileceğini akla getirmelidir. *Burkholderia* türlerinin rutin uygulamalarda iki veya daha fazla çalışılmasının doğru tanımlama açısından faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Son yapılan çalışmalarda *Burkholderia* türlerinin geleneksel yöntemler ve MALDI-TOF MS ile hatalı tanımlamalar olması nedeni ile, doğru tanımlama için moleküler yöntemler önerilmektedir (115). Moleküler yöntemlerin çoğunun yüksek

maliyet ve deneyimli personel gereksiniminden dolayı rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın kullanımları mümkün olamamıştır. Literatürde fenotipik ve moleküler yöntemlerin karşılaştırıldığı çalışmalarda, farklı moleküler yöntemler (Tüm hücre protein elektroforezi, 16S rRNA dizileme, *recA* geni dizileme, MLSA, tüm genom dizi analizi) altın standart olarak kullanılmış olsa da, literatürde bu yöntemlere ait çeşitli avantaj ve dezavantajlar bildirilmiştir (116).

Çalışmamızda kullanılan MLSA yönteminde analiz edilen yedi ‘housekeeping’ geninin dizilenmesi, *Burkholderia* türleri için güvenilir tanımlama sağlamaktadır. Bu yöntem yakın ilişkili türler arasında ve türlerin kendi içindeki ilişkileri ortaya çıkarmak için üstün bir çözünürlüğe sahiptir (117). Baldwin ve ark. (118) Bcc bakterilerinin MLST ve MLSA için kullanılabilen yedi lokusun amplifikasyonu ve sekans analizi için bir şema geliştirilmiştir. Bu şema ile Bcc türleri birbirinden net olarak ayrılmış ve çok sayıda dizi tipi belirlenmiştir. Spilker ve ark. (119) bu lokusları, Bcc ve diğer *Burkholderia* türlerinde daha güvenilir bir şekilde çoğaltmak için, Bcc MLSA şemasındaki lokusları hedefleyen PCR primerlerini yeniden tasarlamıştır. Yeni tasarlanan şemada amplifikasyon ve DNA dizilemesi için lokus başına tek bir primer setinin kullanılması mümkün olmuştur. Vanlaere ve ark. (120) Bcc türleri arasındaki birleşik allel sekanslarının ortalama nükleotid uyumsuzluğunu karşılaştırmış ve Bcc türlerini ayırt etmek için %3'lük bir uyumsuzluğun eşik değeri olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Türler arasındaki çeşitlilik *B. vietnamiensis* suşları arasında %0,4 iken, *B. anthina* suşlarında ise %2,9 olarak tespit edilmiştir. *Burkholderia cepacia* kompleks türlerinin diğer *Burkholderia* türlerine ait türler arası nükleotit uyumsuzluk değerleri en az %7,5 olarak bildirilmiştir.

Multilokus sekans analizinin en büyük dezavantajları emek yoğun ve yüksek maliyetli olmasıdır. Buna rağmen son yayınlarda bu yöntemin önerilmesinin nedeni olarak, diğer yöntemlerle aşılamayan sorunların MLSA ile büyük ölçüde ortadan kalkmış olması olarak gösterilmektedir (121). Örneğin, Bcc'yi tanımlamak için 16S rRNA gen bazlı PCR analizi yaygın kullanılan genotipik yöntemlerden biri olmuştur. 16S ve 23S rRNA gen dizilerine dayanılarak *B. multivorans*, *B. vietnamiensis* ve *B. dolosa* için spesifik PCR testleri geliştirilmiştir, ancak diğer Bcc bakterilerinin tür düzeyinde tanımlanmasında faydalı bulunmamıştır (122). Segonds ve ark. (123) ilk

beş Bcc türü için etkili bir tanımlama aracı olarak AluI, KfoI, DdeI ve MspI ile restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizm analizini takiben, 16S rRNA gen temelli PCR'yi önermişlerdir. Tek bir PCR ile elde edilen amplikonun ilk üç restriksiyon enzimiyle kesilmesi basit ve *B. multivorans*, *B. stabilis* ve *B. vietnamiensis*'i tanımlamak için yeterli olsa da, Fiore ve ark. (124) *B. cepacia* ve *B. cenocepacia* 'yı bu yöntemle birbirinden ayırmanın mümkün olmadığı bildirmişlerdir. Bununla birlikte, daha kapsamlı bir suş araştırması incelendiğinde, Vermis ve ark. (125) incelenen 10 Bcc türü içinde, sadece *B. dolosa*'nın kesin olarak tanımlanabileceğini ve *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. ambifaria*, *B. anthina* ve *B. pyrrocinia* suşlarının genellikle ayırt edilemediğini göstermiştir. Ayrıca *B. vietnamiensis* ve *B. ubonensis* de aynı 16S rRNA gen restriksiyon profillerini paylaşmaktadır.

Mahenthiralingam ve ark. (126) tarafından Bcc'de *recA* geninin taksonomik çözünürlüğü gösterildikten sonra, tür tanımlaması için yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılan yöntem *recA* geni dizilemesi olmuştur. Çeşitli çalışmalarda, bu bakterilerin *recA* genlerinin farklı Bcc türleri arasında %94-95, aynı türde ise %98-99 benzerlik gösterdikleri bildirilmiştir (127). Bununla birlikte, genotipik olarak benzer *Burkholderia* suşları ile enfekte KF hastalarında farklı klinik sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Bunun en çarpıcı örneği; *B. cenocepacia* 'nın farklı *recA* allelleri ile dört alt popülasyonu (*B. cenocepacia* IIIA, IIIB, IIIC ve IIID) içeriyor olmasına rağmen, hemen hemen tüm klinik izolatların IIIA ve IIIB alt gruplarında bulunmasıdır (82). Ayrıca, *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria* ve *B. anthina* tanısı için *recA* geni türevi olan türlere özgü primer çiftleri geliştirilmiştir; ancak son çalışmalar bu primerlerin bazılarının çok duyarlı veya özgül olmadığını göstermiştir (116).

Modern tanımlama standartları olarak ortaya çıkan ve MLSA alternatifi olarak gösterilen tüm genom analizleri, klinik izolatların genotipleme verilerini yüksek doğrulukta sağlayabilmenin yanı sıra, yatay gen transferi ile hızla evrimleşen suşların tanımlanmasına da olanak sağlar (82). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, *Burkholderia* cinsindeki farklı patojenik türler arasında genomik adaların transfer edilebileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada, Bcc klinik izolatlarının genom tabanlı analizi kullanılarak, *Burkholderia pseudomallei* EY1 suşunda bulunana çok benzeyen yeni bir genomik ada (BcenGI15) ile karakterize olan ve daha önce bilinmeyen *B.*

cenocepacia klonu tanımlanmıştır (128). Başka bir çalışmada, *Burkholderia* türlerinin adaptasyonu in vitro stres koşullarında gösterilmiş olup, suboptimal üreme koşullarına (antibiyotik baskısı, biyofilm) yanıt olarak ortaya çıkabilecek mutasyonların klonal soylarda birikebildiği vurgulanmaktadır. Buna örnek olarak, Sırbistan'daki KF popülasyonunda yaygın olan bir epidemik *B. cenocepacia* klonunun (ST856), akciğere adaptasyonunun bir sonucu olarak virülans ve genotipte varyasyonlara maruz kaldığı gösterilmiştir (129). Kronik enfeksiyonlar sırasında patojenlerin adaptasyonu, uygun terapötik stratejinin seçilmesinde büyük öneme sahiptir, ancak Bcc için altta yatan moleküler mekanizmalar hala anlaşılamamıştır. Genomik bir yaklaşım, kronik akciğer enfeksiyonları sırasında Bcc türlerinin adaptasyonu konusunda daha fazla bilgi sağlayabilmelidir, ancak mevcut tüm genom analizleri Bcc suşlarının stres altındaki çeşitliliğini değerlendirmek ve klinik sonucu tahmin etmek için henüz yeterli değildir (130).

Çalışmamızda geleneksel yöntemlerle çalışılmış ve stoklanmış *Burkholderia* türleri MLSA ile değerlendirilmiş olup, en sık görülen türler sırasıyla *B. cenocepacia* (%42) ve *B. contaminans* (%29) olarak saptanmıştır. Literatürde en sık izole edilen *Burkholderia* türleri ile ilgili çalışmalar bölgesel farklılıklar göstermektedir. 1990'ların sonlarından itibaren, Bcc genomovar III olarak bilinen *B. cenocepacia*'nın, KF hastalarında en sık görülen Bcc patojeni olduğunu gösterilmiştir (131). Avustralya ve Avrupa'nın birçok ülkesinde en yaygın olarak *B. cenocepacia* saptanırken, ABD, Kanada, Birleşik Krallık ve Fransa'da şu anda en yaygın türün *B. multivorans* olduğu bildirilmiştir (132-135). Ayrıca Bcc üyesi olmayan *Burkholderia gladioli*, giderek daha fazla görülmeye başlamış olup; ABD'deki yaygın üçüncü *Burkholderia* türü haline gelmiştir. Bu tür Avrupa'daki KF hastalarında yaygın değildir (136).

Agodi ve ark. (137) tarafından İtalya'daki KF merkezlerinden toplanan izolatlarla yapılan *recA* temelli bir çalışmada, en sık *B. cenocepacia* (%69) izole edilmiştir. Diğer çalışmalarda ise Portekiz'de %85 ile *B. cepacia*, Danimarka'da %92 ile *B. multivorans*, Slovakya'da ise %54 ile *B. stabilis* en sık izole edilen türler olmuştur (138-140). İngiltere'de CFASS (Cystic Fibrosis Antibiotic Susceptibility Service) tarafından yapılan bir çalışmada ise kistik fibrozis hastalarında en sık *B. multivorans* (%58), ikinci sıklıkta *B. cenocepacia* (%36) bildirilmiştir (141).

Ülkemizde *Burkholderia* türlerinin moleküler yöntemle tanımlandığı tek çalışma 2006 yılında Yurdakul ve ark. (142) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada değerlendirilen KF'li hasta popülasyonuna ait 85 balgam örneğinin 2'si (%2,6) manuel ve otomatize fenotipik testlerle Bcc saptanmış olup, bu izolatların bir tanesi *recA* PCR ve restriksiyon enzim analizi ile doğrulanmıştır. Çalışmamız ülkemizde *Burkholderia*'ların tanımlanması, MLSA tiplerinin belirlenmesi, biyofilm oluşumu ve sinerji testleri yönünden yapılan ilk çalışma olmuştur. Literatürde *Burkholderia* türlerinin tanımlanmasında ülkeler arasında farklı sonuçlar elde edilmesi ulusal tedavi planlarının oluşturulmasında bölgesel özelliklerin bilinmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Klinik izolatların sekans tiplerinin belirlenerek epidemiyolojik veri sağlaması MLST yönteminin önemli bir avantajıdır. Çalışmamızda değerlendirilen 38 izolatın en az on farklı sekans tipinde dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Mevcut veritabanındaki sekans tipleri ile eşleşmeyen iki izolatın, yeni sekans tipi olması muhtemeldir. Hastaların hiçbirinde iyi bilinen epidemik suşlar (ST-28, ST-32 ve ST-16) saptanmamıştır. Bu çalışmadaki en geniş sekans tipi çeşitliliği *B. cenocepacia* izolatlarında görülmüş olup, dört farklı sekans tipi (ST-602, ST-740, ST-839 ve ST-1392) içermektedir. Bu izolatlar bilinen bir klonal komplekse ait değildir. Değerlendirdiğimiz tüm izolatların sekans tipleri arasında ikinci sıklıkta görülen ST-839, Gautam ve ark. (143) tarafından 2017 yılında Hindistan'da yapılan bir çalışmada ilk defa tanımlanmış ve bu çalışmada en sık saptanan üçüncü sekans tipi olarak bildirilmiştir. Bu izolatın farklı coğrafi bölgelerde yüksek sıklıkta tespit edilmesi epidemiyolojik açıdan önemli bir bulgudur. Değerlendirdiğimiz izolatlar arasında en sık tespit edilen sekans tipi *B. contaminans* ST-102 olup, mevcut literatürde bu sekans tipine ait Rusya'dan bildirilmiş izolatlar bulunmaktadır (144). Bizim yaptığımız çalışma ülkemizdeki *Burkholderia* türleri ile ilgili elde edilen ilk sekans tipinin yapıldığı çalışmadır. Ayrıca, *B. cenocepacia* ST-602 ve *B. contaminans* ST-102'nin KF ve KF olmayan hastalarda saptanmış olması, gelecekte yapılacak bu bakterilerin virülans faktörleri ile ilişkili araştırmalar ve epidemiyolojik çalışmalara ışık tutacaktır.

Bazı Bcc suşları yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaları nedeni ile popüler hale gelmiştir. Bunlar arasında Birleşik Krallık ve Kanada'da bulunan KF

merkezlerindeki ciddi enfeksiyonlardan ve ölümlerden sorumlu kıtalararası yayılım gösteren ET12 klonu (Edinburgh-Toronto) muhtemelen en iyi bilinen klon olmuştur. Yüksek oranda bulaşıcı bu klonun en önemli temsilcisi *B. cenocepacia* J2315 suşu olup, literatürde ilk genom sekansı yapılan ve en fazla çalışılan türdür (145). Diğer ünlü PHDC klonu ise KF merkezleri arasında yayılım gösteren suşlara diğer bir örnek olarak verilebilir. Bu klon, ABD'deki bir KF merkezinde %20 civarında prevalansa sahipken, başka bir KF merkezinde de izole edilmiş ve bu merkezde prevalansının hızla arttığı gözlenmiştir. Bu yayılımın ilk merkezde takip edilen enfekte hastalardan birinin, diğer merkeze nakledilmesi sonrasında olduğu gösterilmiştir (146). Coenye ve ark. (147) tarafından daha sonra yapılan bir çalışmada, PHDC klonunun Fransa, İtalya ve Birleşik Krallık'taki hastalarda da bulunduğu gösterilmiş olup, transatlantik yayılım gösterdiği saptanan ikinci Bcc klonu olmuştur. İlginç olarak, kıtalararası yayılım gösteren bu türler *B. cenocepacia* olmakla birlikte, Kanada ve Avrupa'da KF hastalarına yayılan ET-12 klonu (ST28) ve Çek klonu (ST32) IIIA altgrubuna aittir. ABD'de baskın olan *B. cenocepacia* suşları, Midwest klonu ve PHDC klonu altgrup IIIB'nin bir parçasıdır. Diğer yandan *B. cenocepacia* IIIC grubu yalnız çevreden ve IIID suşları ise sadece İsveç, Arjantin ve İtalya'da KF hastalarından izole edilmiştir (132). İlginç olarak çalışmamızda epidemik görülen bu evrensel klonlara ait türler saptanmamıştır. Bu türlerin ülkemizde bulunup bulunmadığını değerlendirmek amacıyla ulusal ölçekte büyük bir epidemiyolojik çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Bizim çalışmamızın MLSA sonuçlarına göre ikinci en sık görülen tür olan *B. contaminans* (%29) ilk olarak 2009 yılında tanımlanmış olup, bu tarihten sonra yapılan çalışmalarda daha sık bildirilmeye başlamıştır. Bu bakterinin rutinde kullanılan otomatize sistemlerin çoğunun veritabanında henüz bulunmuyor olması nedeniyle, tanımlama sırasında benzer özelliklere sahip olan diğer türlerin tanımlandığı düşünülmektedir (148). Arjantin'de yapılan bir çalışmada *B. contaminans* olguların %57'sinde saptanmış ve en sık görülen tür olarak bildirilmiştir (149). Medina-Pacual ve ark. (150) tarafından İspanya'da yapılan bir çalışmada 2008-2012 yılları arasında KF hastalarındaki Bcc enfeksiyonlarının surveyansı araştırılmış ve bu araştırmada *B. contaminans* insidansı %36 olarak saptanmış ve daha önce dominant türler olan *B. cenocepacia* ve *B. multivorans*'ın yerini aldığı

bildirilmiştir. İlginç olarak, Portekiz KF popülasyonunda KF hastalarını enfekte eden iki *B. contaminans* klonu, Portekiz'deki resmi otoritelerin yaptığı rutin sürveyans sırasında iki steril olmayan nazal salin (%0.9 NaCl) solüsyonunda saptanan *B. contaminans* izolatından ayırtedilemez olarak saptanmıştır (138). İsviçre'de yapılan ve 1998-2013 yılları arasında KF hastalarında izole edilen Bcc türlerinin sıklığının incelendiği bir çalışmada ise en sık izole edilen tür *B. cenocepacia* olmakla birlikte, *B. multivorans* ve *B. contaminans* sıklığının araştırma periyodunun son yıllarında arttığı bildirilmiştir (151). Kanada'da yapılan kistik fibrosis hastalarındaki Bcc enfeksiyonlarının 30 yıl süreyle takip edildiği bir çalışmada, enfeksiyon kontrol politikalarının Bcc epidemiyolojisine belirgin etkisi olduğu kanıtlanmıştır. 1995 yılında güncel enfeksiyon kontrol yöntemlerinin uygulanmaya başlamasıyla dominant tür olan *B. cenocepacia* 'nın yerini *B. multivorans*'ın aldığı bildirilmiştir. Bu çalışma ve benzerlerinin vurguladığı gibi KF hastalarından izole edilen Bcc türleri üzerine enfeksiyon kontrol önlemlerinin oldukça etkili olup, önceki dönemlerde epidemik *B. cenocepacia* türleri baskın iken, son yıllarda klonal olmayan *B. multivorans* ve *B. contaminans* ön plana çıkmıştır (34).

Bakterilerin tür düzeyinde doğru tanımlanması ve bölgelere göre baskın türlerin bilinmesi tedavinin doğru planlanmasında iki önemli aşamadır. Diğer anlaşılması gereken konulardan biri ise bakterilerin patogenevidir. *Burkholderia* türlerinin bakterilerin konak savunma sisteminden kaçarak enfeksiyon başlatabilmesinde ve uygun tedaviye rağmen enfeksiyonun kronikleşmesinde bakterinin biyofilm oluşturabilme yeteneği önemli rol oynamaktadır. (152). *Burkholderia* türlerinde biyofilm gelişiminin fiziksel mekanizmaları ve biyofilm oluşumu ile ilgili yapılan çalışmalara rağmen, hala klinik izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri ve bunların türler arasında nasıl değiştiği hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Schwab ve ark. (153) tarafından yapılan bir çalışmada biyofilm oluşturan ve oluşturmayan Bcc türleri kullanılarak insan solunum yolu epiteli hücre kültüründe biyofilm oluşumu ve invazyon ilişkisi gösterilmeye çalışılmış ve tüm bakterilerin epiteli invaze ettiği ancak farklı yollar kullandığı gösterilmiştir. Bu çalışmada biyofilm oluşturan izolatların doğrudan epitel invazyonu yaparak ve epitel hücre yıkımına yol açtığı ancak biyofilm oluşturmayan bakterilerin epitel hücrelerinin arasında lokalize olduğu elektron mikroskopi görüntüleri ile tespit

edilmiştir. Caraher ve ark. (154) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise *B. dolosa*, *B. cenocepacia* ve *B. multivorans* izolatlarının çalışmada kullanılan diğer Bcc türlerine göre daha fazla biyofilm yaptığı ve solunum yolu epiteline daha yüksek miktarda invazyon yaptığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda KF ve KF olmayan hastalardan elde edilen Bcc izolatlarının biyofilm üretme yetenekleri mikropalak yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bu yöntem biyofilm çalışmalarında yaygın kullanılan maliyet etkin ve güvenilir bir yöntemdir. (155). Mishra ve ark. (156) tarafından yapılan bir çalışmada mikropalak yöntemi değerlendirilen *Burkholderia* türleri için uygun bir yöntem olarak tespit edilmiştir. *Burkholderia* türlerinin biyofilm oluşumunun türler arasındaki farkının klinik sonuçlara etkisi, enfeksiyonun kalıcılığı veya yayılımı ile ilgili bilgilerimizin artması ve antibiyotik duyarlılığına etkisinin anlaşılması yeni tedavi rejimlerinin oluşturulması oldukça önemlidir. Yaptığımız çalışmada Bcc türleri arasında in vitro biyofilm oluşumu benzer saptanmıştır. Ancak çalışmamızda değerlendirilen izolat sayısının az olması, çalışmamızın en önemli kısıtlılığı olarak düşünülmektedir.

Biyofilm oluşturan bakterilerle gelişen enfeksiyonlarda biyofilm içindeki bakteriyi öldürebilecek bir antibiyotik tedavisinin planlanması bakterinin eradikasyonu için çok önemlidir. Bakterilerin biyofilm oluşturma özelliği ve antibiyotik duyarlılığının ilişkisi çeşitli bakteri türleri için çok sayıda çalışmada incelenmiş olup, son yıllarda yapılan çalışmalarda biyofilm oluşturan bakterilerin antibiyotiklere in-vitro koşullarda daha duyarlı olduğu, ancak biyofilm içine gömülü bakterilerin biyofilmin bariyer etkisi sayesinde antibiyotiklere maruz kalmadığı için persistan olmaya yatkın olduğu vurgulanmıştır (157). *Burkholderia* türleri ile yapılan benzer çalışmalarda birbiriyle çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Peeters ve ark. (158) tarafından yapılan bir çalışmada planktonik ve biyofilm oluşturan izolatların antibiyotik duyarlılıkları arasında anlamlı fark olmadığı gösterilirken, Dales ve ark. (159) tarafından yapılan bir çalışmada ise biyofilm oluşturan türlerin daha dirençli olduğu bildirilmiş ve yüksek doz tobramisin ve meropenem ilave olarak piperasiline-tazobaktam, trimetoprim-sulfametoksazol, amikasin veya seftazidimden birini içeren üçlü tedavi kombinasyonlarının kullanılması önerilmiştir.

Bizim çalışmamızda, in vitro koşullarda biyofilm oluşturan ve oluşturmeyen izolatlar karşı tedavide yaygın kullanılan antibiyotiklerin minimal inhibitör konsantrasyonları incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak çalışmamızda biyofilm içinde kalıcı olarak canlılığını sürdüren ve daha sonra uygun koşullarda üreyerek dirence neden olan bakterilerin varlığı değerlendirilmemiştir. Biyofilm ile ilgili enfeksiyonlarda kalıcı hücrelerin kilit role sahip olduğu düşünülmektedir. Bu hücrelerin vahşi türe ait fenotipik varyantlar olduğu kabul edilmektedir. Biyofilme yüksek dozda antibiyotik uygulanmasıyla bakterilerin çoğu ölmekte, kültürde üremeyen ancak ölmeyen bazı bakteriler kalabilmektedir. Antibiyotiğin ortamdan uzaklaştırılmasıyla hayatta kalan bu kalıcı bakteriler üremeye başlayıp yeni bir enfeksiyona neden olmaktadır. VanAcker ve ark. (57) planktonik hücrelere etkili dozda tobramisin uygulanması ile, *B. cenocepacia* biyofilmlerinin içinde fazla miktarda persistan bakteri kaldığını göstermişlerdir.

Burkholderia türlerinin tedavisinde kullanılacak antibiyotiklerin duyarlılıklarının testinde CLSI seftazidim, meropenem, trimetoprim-sülfametoksazol, minosiklin, tikarsilin-klavulanat ve levofloksasinin raporlanması için standartları belirlemiş, ancak tikarsilin-klavulanat ve levofloksasin için disk difüzyonu yöntemi uygulanmamasını önermiştir (91). Çalışmamızda tüm izolatların seftazidim, meropenem, TMP-SXT ve levofloksasin antibiyotiklerine duyarlılıkları CLSI standartlarına göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirildiğinde sırasıyla %66, %34, %50 ve %60 olarak saptanmış, türler arasında antibiyotik direnci açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca kistik fibrozisli hastalardan elde edilen izolatların KF olmayan hastalardan izole edilenlere göre seftazidime daha duyarlı (KF %80, KF olmayan %38) olduğu saptanmış, test edilen diğer antibiyotiklerin iki hasta grubunda benzer duyarlılık profiline sahip olduğu görülmüştür.

Burkholderia cepacia kompleks nedenli enfeksiyonların ampirik tedavisinde en yaygın olarak trimetoprim-sülfametoksazol, seftazidim ve meropenem kullanılmaktadır. Lupo ve ark. (151) tarafından yapılan çalışmada *B. cenocepacia* izolatlarının seftazidim duyarlılığının %93, tüm test edilen *Burkholderia* izolatlarının seftazidim duyarlılığının %86 olduğu bulunmuştur. Farklı iki çalışmada ise, test

edilen 66 ve 146 klinik Bcc izolatında seftazidime karşı duyarlılık sırasıyla %65 ve %64 olarak bulunmuştur ve bu sonuçlar bizim çalışmamızda saptanan seftazidim duyarlılık değeriyle (%66) benzerlik göstermektedir (101, 160). Abbott ve ark. (161) yaptıkları çalışmada ise test edilen 258 Bcc izolatı için trimetoprim-sülfametoksazole duyarlılık (%52) bizim çalışmamıza benzer şekilde saptanmıştır, bu çalışmada doksisisiklin ve minosiklin ampirik tedavi için oral alternatifler olarak gösterilmiş olup in vitro duyarlılıkları sırasıyla %46 ve %45 bulunmuştur. Çalışmamızın yapıldığı dönemde ve günümüzde ülkemizde minosiklin bulunmadığı için ve doksisisiklin CLSI tarafından Bcc tedavisinde önerilen bir antibiyotik olmadığı için çalışmamızdaki izolatların tetrasiklinlere duyarlılığı değerlendirilmemiştir. Literatürdeki bazı araştırmalarda *Burkholderia* türlerinde meropenem duyarlılığı yüksek bulunmuş olmasına rağmen, bizim çalışmamızda en az duyarlılık meropenemde (%34) gözlenmiştir (162). Dentini ve ark. (163) tarafından yapılan bir çalışmada izolatların meropenem ve seftazidime duyarlılığı sırasıyla %92 ve %83 saptanmış, değerlendirilen izolatların çalışmamızdakilere göre daha duyarlı olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmadaki izolatların trimetoprim-sülfametoksazole %46 duyarlılık gösterdiği saptanmıştır. Duan ark. (164) tarafından yapılan bir çalışmada ise, *B. cepacia*'nın meropenem, trimetoprim-sülfametoksazol, minosiklin ve seftazidim duyarlılıkları sırasıyla %65, %76, %68 ve %74 olarak tespit edilmiştir.

Ülkemizde yapılan *Burkholderia* türlerinin antibiyotik duyarlılıklarıyla ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Dizbay ve ark. (165) tarafından hastane enfeksiyonlarının beş yıllık sürveyansını inceleyen bir çalışmada *B. cepacia* izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile değerlendirilen seftazidim, meropenem ve TMP-SXT duyarlılıkları sırasıyla %38, %51 ve %44 saptanmıştır. Şener ve ark. (32) tarafından KF hastalarından elde edilen beş *B. cepacia* izolatının disk difüzyon yöntemi ile seftazidim duyarlılığı %20, TMP-SXT duyarlılığı %80 tespit edilmiştir. Ocak ve ark. (33) KF hastalarında saptanan iki *B. cepacia* izolatının disk difüzyon yöntemi ile seftazidim, meropenem ve TMP-SXT duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Burkholderia cepacia kompleks enfeksiyonları için antibiyotik tedavisinin klinik yanıtlarını değerlendiren çalışma sayısı oldukça sınırlı olduğu için hastaların tedavisinde in vitro antibiyotik duyarlılık verileri ön planda kullanılmaktadır. Örneğin, pulmoner semptomların alevlenmesini yaşayan kistik fibrozlu hastalarda

Bcc için randomize kontrollü çalışma bulunmamaktadır. Benzer şekilde, 2016 yılında Regan ve Bhatt (166) tarafından yapılan Cochrane sistematik derlemesinde, kistik fibrozisli kişilerde Bcc için eradikasyon tedavisi araştırılmış ve bu alanda herhangi bir güvenilir çalışma bulunamamış ve tedavinin in vitro antibiyotik duyarlılık verileri ve önceki klinik yanıtlar göz önünde bulundurarak olgu bazında değerlendirilmesi önerilmiştir. Bu nedenle, Bcc ile enfekte olan hastalarda farklı antibiyotik rejimlerinin etkinliğini değerlendirmek için kapsamlı klinik çalışmalar yapılana kadar, tedavi alternatiflerinin belirlenmesinde türe özgü ve bölgesel in vitro antibiyotik duyarlılık sonuçlarının bilinmesi ve bu doğrultuda antibiyotik seçilmesi önemlidir. Bununla birlikte, bu bakterilerin in vitro duyarlılık testleri yapılsa da, tüm antibiyotik sınıflarına in vivo direnç geliştirme yeteneğine sahip olabileceği her zaman akılda tutulmalıdır. Buna örnek olarak, 2018 yılına ait bir olgu bildiriminde iki haftalıkken yapılan diyafram hernisi operasyonu sonrası *B. cenocepacia* sepsisi gelişen kistik fibrozisli bir bebekte seftazidim ve trimetoprim-sülfametoksazol tedavisine, in vitro olarak duyarlı olmasına rağmen yanıt alınamadığı, hastanın yeni geliştirilen β -laktamaz inhibitörü avibaktamın tedaviye eklenmesi sonrası düzeldiği bildirilmiştir (167).

Burkholderia türlerinde yüksek oranda içsel ve kazanılmış direnç görülmesi nedeniyle neden olduğu enfeksiyonların antibiyotik kombinasyonlarıyla tedavisi önerilmektedir. *Burkholderia* türlerinin tedavisinde birinci basamak seçilen ilaç TMP-SXT, genellikle bir β -laktam antibiyotik ile kombine edilmektedir. Tedavide kullanılan antibiyotik kombinasyonlarını değerlendiren literatürdeki en kapsamlı çalışmalardan biri Zhou ve ark. (168) tarafından yapılmış, bu çalışmada, meropenem ve TMP-SXT sinerjisi %4 olarak saptanmıştır. Bu bulgu bizim çalışmamız ile benzer bulunmuş olup, klinik izolatlarımızın iki tanesinde (%5) meropenem ve TMP-SXT arasında sinerji saptanmıştır.

Literatürde yapılan diğer sinerji çalışmalarında, Abbot ve ark. (163) tarafından test edilen 1799 antibiyotik kombinasyonundan, tobramisin ile seftazidim sinerjisinin %35, meropenem ile tobramisin sinerjisinin %32 ve piperacillin-tazobaktam ile levofloksasin sinerjisinin %22 olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan Bonacorsi ve ark. (169) tarafından yapılan bir başka çalışmada β -laktam ve tobramisin kombinasyonu ile β -laktam ve siprofloksasin kombinasyonunun öldürme

aktivitesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sinerji görülmemiştir. Bunun yanında, imipenem ve tobramisin arasında Bcc'ye karşı in-vitro bir antagonizma gösterilmiştir. Bu çalışmada, β -laktam-siprofloksasin-tobramisinin üçlü kombinasyonunun, en tutarlı sinerjistik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir ve bunu meropenem ve siprofloksasin kombinasyonu izlemiştir. Çalışmamızda 15 klinik izolatta antagonizma saptanmış, bunların 12 tanesi meropenem ve seftazidim arasında belirlenmiştir ve bu antagonizmanın β -laktamazların indüklenmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Bizim çalışmamızda kısıtlılıklarımızın en önemlisi çalışılan izolat sayısının az olmasıdır. Bunun en önemli nedeni incelemeye aldığımız kistik fibrozis hastalarının takiplerinde yapılan kültürlerde aynı bakterinin izolasyonu ve o hasta için aynı yıl içinde üreyen tek izolatın değerlendirmeye alınmış olmasıdır. Çalışmanın diğer kısıtlılığı ise, -80°C 'de dondurulmuş olan bakterilerle çalışılması nedeniyle dondurup çözme işleminin bakteri fenotipine olası etkisi ve bakterilerin farklı süreler stokta bekleme süresi olarak değerlendirilmiştir. Bu olasılıklar çalışmamızda değerlendirilmemiştir. Çalışmanın üçüncü kısıtlılığı ise elde edilen izolatların alındığı vücut bölgelerinin oksijenizasyon oranları farklı olmasına rağmen, biyofilm oluşturma koşullarının sadece aerobik ortamda değerlendirilmesi olmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Burkholderia cepacia kompleksi benzer genotipik ve fenotipik özelliklere sahip 22 türden oluşan bir gruptur. Çevrede yaygın olarak görülen bu bakteriler kistik fibrozis hastalarını enfekte ettiği takdirde akciğer fonksiyonlarında ciddi bir azalmaya ve hayatı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara neden olabilen önemli bir morbidite ve mortalite faktörü olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 2007-2017 yılları arasında kistik fibrozisli hastalar ve kistik fibrozis olmayan erişkin ve çocuk hastalardan izole edilen *Burkholderia* türlerinin MALDI-TOF MS ve MLSA kullanılarak tür düzeyinde dağılımı, biyofilm oluşumu, in vitro antibiyotik ve kombine antibiyotiklere duyarlılıkları değerlendirilerek bölgesel düzeyde önemli veriler elde edilmiştir.

Çalışmamızdaki klinik isolatlar *Burkholderia* türlerinin tanımlanmasında önerilen moleküler yöntem olan MLSA ile değerlendirilmiş, *B. cenocepacia* (%42) ve *B. contaminans* (%29) en sık görülen türler olarak saptanmıştır. Bölgeler arası en sık görülen türlerin doğru moleküler yöntemlerle saptanması, patojenite ve antimikrobiyal direnci farklı olan bu mikroorganizmalara karşı doğru tedavi planlarının yapılmasında önemlidir. Bu çalışma ülkemizde *Burkholderia* türlerinin moleküler yöntemlerle tanımlandığı ilk çalışma olarak bu amaca hizmet etmektedir.

Burkholderia türlerini MALDI-TOF MS ile tanımlarken yüksek tanımlama skorlarına rağmen, bunların veritabanında henüz bulunmayan isolatlar olabileceği akılda tutulmalıdır. Aynı hastaya ait örnekte veya farklı zamanlarda çalışılmış örneklerde, farklı *Burkholderia* türlerinin tanımlanması hatalı tanımlama olabileceğini akla getirmelidir. *Burkholderia* türlerinin kesin tanısı amacıyla MALDI-TOF MS sonuçları moleküler yöntemlerle doğrulanmalıdır.

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturabilme özellikleri nedeniyle uygun dozda antibiyotik tedavisine rağmen, bakterilerin eradikasyonu her zaman mümkün olmamaktadır. Çalışmada KF ve KF olmayan hastalardan izole edilen türler arasında biyofilm üretiminde ve biyofilm üretiminin antibiyotik direncine etkisinde anlamlı

bir fark tespit edilmemiş olmasına rağmen, çalışılan suş sayısının sınırlı olması nedeni ile daha büyük ölçekli bir çalışma gerekli olduğu kanısındayız.

Literatürde *Burkholderia* türleri ile meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde sınırlı sayıda çalışma ve rehber bulunmaktadır. Mevcut yayınlarda tedavinin in vitro antibiyotik duyarlılık verileri ve önceki klinik yanıtlar göz önünde bulundurarak olgu bazında değerlendirilmesi önerildiğinde, türe özgü ve bölgesel in vitro antibiyotik duyarlılık sonuçlarının bilinmesi ve bu doğrultuda antibiyotik seçilmesi çok önemlidir. Çalışmamızda tüm izolatların seftazidim, meropenem, TMP-SXT ve levofloksasin antibiyotiklerine duyarlılıkları CLSI standartlarına göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirildiğinde sırasıyla %66, %34, %50 ve %60 olarak saptanmış, türler arasında antibiyotik direnci açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Ayrıca kistik fibrozisli hastalardan izole edilen türlerin, KF olmayan hastalardan izole edilenlere göre seftazidime daha duyarlı olduğu saptanmış, test edilen diğer antibiyotiklerin iki hasta grubunda benzer duyarlılık profiline sahip olduğu görülmüştür.

Bu çalışmanın bulguları ülkemizde üçüncü basamak bir hastanede izole edilen Bcc popülasyonunun tür düzeyinde tanısı, biyofilm oluşturma özellikleri ve antibiyotik duyarlılıkları hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Kistik fibrozisli ve KF olmayan hastalarda Bcc türlerinin farklılığını anlamak, etkili epidemiyoloji ve sürveyans analizi yapmak için bu türde çalışmaların Türkiye'nin tamamını kapsayacak şekilde, daha fazla hastaneden daha büyük bir izolat koleksiyonu ile genişletilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. The nonfermentative gram-negative bacilli. In: Winn W AS, Jande W, Koneman E, Procop G, Schrekernbenger P, Woods G, editors. Koneman's Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. Baltimore, USA: Lippincott Williams and Wilkins Publishers; 2006. P. 303-91
2. Gillis M, Van TV, Bardin R, Goor M, Hebbbar P, Willems A, ve ark. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. Int J Syst Bacteriol. 1995; 45: 274–289
3. Coenye, T, Vandamme, P, Govan, JR, LiPuma, J.J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. J. Clin. Microbiol. 2001; 39,3427–3436.
4. Burkholder, W.H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. Phytopathology. 1950; 40, 115.
5. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, ve ark. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol Immunol. 1992;36(12):1251-75.
6. Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.:proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff1973) comb. nov, *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiol Immunol. 1995; 39: 897–904
7. Coenye T, Laevens S, Willems A, Ohlén M, Hannant W, Govan JR, Gillis M, Falsen E, Vandamme P.*Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov, two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51(Pt 3):1099-107.
8. List of prokaryotik names with standing in nomenclature. [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi: 20 Kasım 2018]. Erişim adresi: <http://www.bacterio.net/Burkholderia.html>
9. Henry, D.A, Mahenthiralingam, E, Vandamme, P, Coenye, T, Speert, D.P. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. J. Clin. Microbiol. 2001; 39, 1073–1078.
10. Vandamme, P, Holmes, B, Vancanneyt, M, Coenye, T, Hoste, B, Coopman, R, ve ark. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol.1997; 47, 1188–1200.

11. Rosenberg, Eugene DeLong, E.F, Lory, S, Stackebrandt, E, Thompson, F. The Prokaryotes. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014
12. Bach E, Sant'Anna FH, Magrich Dos Passos JF, Balsanelli E, de Baura VA, Pedrosa FO, ve ark. Detection of misidentifications of species from the *Burkholderia cepacia* complex and description of a new member, the soil bacterium *Burkholderia catarinensis* sp. nov. Pathog Dis. 2017; 31;75(6).
13. Liao CH, Chang HT, Lai CC, Huang YT, Hsu MS, Liu C, ve ark. Clinical characteristics and outcomes of patients with *Burkholderia cepacia* bacteremia in an intensive care unit. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011 Jun;70(2):260-6.
14. Dolan SA, Dowell E, LiPuma JJ, Valdez S, Chan K, James JF. An outbreak of *Burkholderia cepacia* complex associated with intrinsically contaminated nasal spray. Infect Control Hosp Epidemiol 2011; 32 (8):804–10.
15. Metcalf P, Newman K, Siegel JD, ve ark. Notice to readers: nosocomial *Burkholderia cepacia* infections associated with exposure to sublingual probes — Texas, 2004.MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report 2004; 53(34): 796.
16. Song JE, Kwak YG, Um TH, Cho CR, Kim S, Park IS, ve ark. Outbreak of *Burkholderia cepacia* pseudobacteraemia caused by intrinsically contaminated commercial 0.5%chlorhexidine solution in neonatal intensive care units. J Hosp Infect 2017; 98 (3):295–9.
17. Sommerstein R, Fuhrer U, Lo Priore E, Casanova C, Meinel DM, Seth-Smith HMB, ve ark. *Burkholderia stabilis* outbreak associated with contaminated commercially- available washing gloves, Switzerland, May 2015 to August 2016. Eurosurveillance 2017; 22 (49):23–32 .
18. Koruk ST, Bayraktar M, Koruk İ, Yılmaz L. Üriner sistoskop kontaminasyonu sonrası gelişen hastane kaynaklı *Burkholderia cepacia* salgını. ANKEM 2010; 24(4): 193-7.
19. Baldwin A, Mahenthiralingam E, Drevinek P, Vandamme P, Govan JR, Waine DJ, ve ark. Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. Emerg Infect Dis 2007; 13 (3):458–61 .
20. Drevinek P, Mahenthiralingam E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. Clin Microbiol Infect. 2010;16(7):821-30.
21. Sousa SA, Ramos CG, Leitão JH. *Burkholderia cepacia* Complex: Emerging Multihost Pathogens Equipped with a Wide Range of Virulence Factors and Determinants.Int J Microbiol. 2011; pii: 607575.
22. Millar-Jones L, Ryley HC, Paull A, Goochild MC. Transmission of *Burkholderia cepacia* in Welsh cystic fibrosis subjects. Respir Med 1998; 92:178-183.

23. Muhdi K, Edenborough FP, Gumery L, O'Hickey S, Smith EG, Smith DL, ve ark. Outcome for patients colonised with *Burkholderia cepacia* in a Birmingham adult cystic fibrosis clinic and the end of an epidemic. *Thorax* 1996; 51:374- 377.
24. Holmes A, Nolan R, Taylor R, Finley R, Riley M, Jiang RZ, ve ark. An epidemic of *Burkholderia cepacia* transmitted between patients with and without cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1999; 179:1197-1205.
25. Steinbach S, Sun L, Jian R-Z, Flume P, Gilligan P, Egan TM. Transmissibility of *Pseudomonas cepacia* infection in clinic patients and lung-transplant recipients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331:981-987.
26. Govan JR, Hughes J, Vandamme P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol* 1996; 45:395-407.
27. Pegues DA, Carson LA, Tablan OC, FitzSimmons SC, Roman SB, Miller JM, ve ark. Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis. Summer Camp Study Group. *J Pediatr* 1994; 124:694-702.
28. LiPuma JJ, Spilker T, Coenye T, Gonzalez CF. An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *Lancet* 2002; 359:2002-2003.
29. Cystic Fibrosis Foundation 2014 report. [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi: 20 Kasım 2018]. Erişim adresi:<https://www.cff.org/2014-Annual-Data-Report.pdf>
30. European Cystic Fibrosis Society Patient Registry Annual Data report 2016. [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi: 20 Kasım 2018]. Erişim adresi:https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-contentimages/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Report2016_06062018.pdf
31. Lynch JP. *Burkholderia cepacia* complex: impact on the cystic fibrosis lung lesion. *Semin Respir Crit Care Med*. 2009; 30:596-610. DOI:10.1055/s-0029-1238918.
32. Şener B, Günalp A, Özçelik U, Göçmen A. Kistik fibrozis olgularının 5 yıllık mikrobiyolojik değerlendirmesi. *Mikrobiyol Bul* 1996; 30(4): 343-51.
33. Ocak F, Gözalan A, Özçelik U, Anadol D, Kiper N, Aktepe OC, ve ark. Isolation frequency of *Burkholderia cepacia* from cystic fibrosis patients. *Mikrobiyol Bul*. 2002;36(1):1-10.
34. Zlosnik, J. E, Zhou, G, Brant, R, Henry, D. A, Hird, T. J, Mahenthalingam, E, ve ark. *Burkholderia* species infections in patients with cystic fibrosis in British Columbia, Canada. 30 years' experience. *Ann. Am. Thorac. Soc*. 2015;12, 70–78.
35. Baldwin, A, Sokol, P, Parkhill, J, and Mahenthalingam, E. The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect. Immun*. 2004; 72, 1537–1547.

36. Liu, L, Spilker, T, Coenye, T, and LiPuma, J. J. Identification by subtractive hybridization of a novel insertion element specific for two widespread *Burkholderia cepacia* genomovar III strains. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41, 2471–2476.
37. Urwin, R, and Maiden, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 2003; 11, 479–487.
38. Coenye T, and LiPuma, JJ. Multilocus restriction typing: a novel tool for studying global epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* 2002; 185, 1454–1462.
39. Saiman, L, Siegel, J. D, LiPuma, JJ, Brown, R. F, Bryson, E. A, Chambers, M. J, ve ark. Infection prevention and control guideline for cystic fibrosis: 2013 update. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2014; 35, S1–S67.
40. Dedeckova, K, Kalferstova, L, Strnad, H, Vavrova, J, and Drevinek, P. Novel diagnostic PCR assay for *Burkholderia cenocepacia* epidemic strain ST32 and its utility in monitoring infection in cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* 2013; 12, 475–481.
41. Segonds, C, Thouverez, M, Barthe, A, Bossuet-Greif, N, Tisseyre, L, Plésiat, P, ve ark. Development of a multiple-locus variable-number tandem repeat typing scheme for genetic fingerprinting of *Burkholderia cenocepacia* and application to nationwide epidemiological analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53, 398–409.
42. Eusebio, N, Coutinho, C. P, Sá-Correia, I, and Araujo, R. SNaPBcen: a novel and practical tool for genotyping *Burkholderia cenocepacia*. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51, 2646–2653.
43. Sousa SA, Feliciano JR, Pita T, Guerreiro SI, Leitão JH. *Burkholderia cepacia* complex regulation of virulence gene expression: A review. *Genes (Basel).* 2017;19;8(1).
44. Shimomura, H. Unusual interaction of a lipopolysaccharide isolated from *Burkholderia cepacia* with polymyxin B. *Infect. Immun.* 2003; 71, 5225–5230.
45. Kumar B, Cardona ST. Synthetic cystic fibrosis sputum medium regulates flagellar biosynthesis through the *flhF* gene in *Burkholderia cenocepacia*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 6:65.
46. Lamothe J, Huynh KK, Grinstein S, Valvano MA. Intracellular survival of *Burkholderia cenocepacia* in macrophages is associated with a delay in the maturation of bacteria-containing vacuoles. *Cell Microbiol.* 2007; 9(1):40-53.
47. Depluvere S, Devos S, Devreese B. The Role of Bacterial Secretion Systems in the Virulence of Gram-Negative Airway Pathogens Associated with Cystic Fibrosis. *Front Microbiol.* 2016; 30;7:1336.
48. Thomas MS. Iron acquisition mechanisms of the *Burkholderia cepacia* complex. *BioMetals.* 2007; 20:431-452.

49. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002 Sep;8(9):881-90.
50. Holden MTG, Seth-Smith HMB, Crossman LC, ve ark. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J Bacteriol.* 2009; 191(1):261-277.
51. Moreira LM, Videira PA, Sousa SA, Leitão JH, Cunha M V, Sá-Correia I. Identification and physical organization of the gene cluster involved in the biosynthesis of *Burkholderia cepacia* complex exopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 312(2):323-333.
52. Dalton HM, March PE. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Curr Opin Biotechnol.* 1998 ;9(3):252-5.
53. Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014 Sep;78(3):510-43.
54. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, ve ark. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc.* 2018 Jan;81(1):7-11
55. Subramoni S, Sokol PA. Quorum sensing systems influence *Burkholderia cenocepacia* virulence. *Future Microbiol.* 2012; 7(12):1373-1387.
56. Tomlin KL, Malott RJ, Ramage G, Storey DG, Sokol PA, Ceri H. Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71:5208-5218.
57. Van Acker H, Sass A, Bazzini S, De Roy K, Udine C, Messiaen T, ve ark. Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species. *PLoS One.* 2013;8(3):e58943.
58. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, ve ark. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol.* 2017 May;43(3):313-351.
59. Kwasny SM, Opperman TJ. Static biofilm cultures of Gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol.* 2010;Chapter 13:Unit 13A.8.
60. Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis, ve ark. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clin Microbiol Rev.* 2018 Apr 4;31(3).
61. Brown SD, White R, Tobin P, Brown SD, White R, Tobin P. Keep them breathing: Cystic fibrosis pathophysiology, diagnosis, and treatment. *JAAPA.* 2017 May;30(5):23-27.
62. Aydemir O, Kiper N. Dünyada ve ülkemizde kistik fibrozis hastalığı. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007;3:S 1-3

63. Guillot L, Beucher J, Tabary O, ve ark. Lung disease modifier genes in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;52:83-93.
64. Hartl D, Gaggar A, Bruscia E, Hector A, Marcos V, Jung A, ve ark. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros.* 2012;11(5):363-82.
65. Ralhan A, Laval J, Lelis F, Ballbach M, Grund C, Hector A, ve ark. Current Concepts and Controversies in Innate Immunity of Cystic Fibrosis Lung Disease. *J Innate Immun.* 2016;8(6):531-540
66. Koller B, Bals R, Roos D, Korting HC, Griesse M, Hartl. Innate immune receptors on neutrophils and their role in chronic lung disease. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 535–547.
67. Ratjen FA. Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. *Respir Care.* 2009 ;54(5):595-605.
68. Gilchrist FJ, Webb AK, Bright-Thomas RJ, Jones AM. Successful treatment of cepacia syndrome with a combination of intravenous cyclosporin, antibiotics and oral corticosteroids. *J Cyst Fibros.* 2012;11(5):458-60.
69. Maschmeyer G. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone; 2009
70. LiPuma JJ CB, Lum GD, Vandamme PAR. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas* and *Acidovorax*. Murray PR BE, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical Microbiology. Washington, DC: ASM Press; 2007.
71. Henry D, Campbell M, McGimpsey C , Clarke A , Loudon L , Burns JL, ve ark. Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (4):1004–7 .
72. Gautam V, Ray P, Vandamme P, Chatterjee SS, Das A, Sharma K, ve ark. Identification of lysine positive non-fermenting gram negative bacilli (*Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* complex). *Indian J Med Microbiol* 2009;27:128-33
73. McMenamin JD, Zacccone TM, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers: an analysis of 1,051 recent sputum isolates. *Chest* 2000;117:1661-5.
74. Brisse S, Stefani S, Verhoef J, Van Belkum A, Vandamme P, Goessens W. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1743-8.
75. van Pelt C, Verduin C , Goessens WH , Vos MC , Tummler B , Segonds C, ve ark. Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. *J Clin Microbiol.* 1999; 37 (7):2158–64 .

76. Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, Beretti JL, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2008 ;46(10):3361-7.
77. Plongla R, Panagea T, Pincus DH, Jones MC, Gilligan PH. Identification of *Burkholderia* and Uncommon Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Patients with Cystic Fibrosis by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) . *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):3071-3072.
78. Lynch KH, Dennis JJ. Development of a species-specific *fur* gene-based method for identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):447-55.
79. Pot, B, Vandamme, P, Kersters, K. Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprinting. In: Goodfellow, M, O'Donnell, A.G. (Eds.), *Modern Microbial Methods: Chemical Methods in Bacterial Systematics*, Wiley, Chichester, United Kingdom:1994
80. Welch, D.F. Applications of cellular fatty acid analysis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991; 4, 422–438.
81. Vandamme P, Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34(2):87-95
82. Vermis, K, Coenye, T, Mahenthiralingam, E, Nelis, H.J, Vandamme, P. Evaluation of species-specific *recA*-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51,937–940.
83. Maiden, M. C. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95, 3140–3145
84. Richter, M, Rosselló-Móra, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009; 106, 19126–19131.
85. Wolfensberger A, Sax H, Weber R, Zbinden R, Kuster SP, Hombach M. Change of antibiotic susceptibility testing guidelines from CLSI to EUCAST: influence on cumulative hospital antibiograms. *PLoS One.* 2013;8(11):1–8
86. Garcia, Lynne Shore; Isenberg, Henry D. 3rd ed. / editor in chief, third edition and 2007 update, Lynne S. Garcia. Washington, DC : ASM Press, 2010.
87. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 2009 Dec 1;49(11):1749-55.

88. Leclercq R, Cantón R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, ve ark. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(2):141-60.
89. Zahariadis G, Levy MH, Burns JL. Cepacia-like syndrome caused by *Burkholderia multivorans*. *Can J Infect Dis.* 2003 ;14(2):123-5.
90. McGowan JE. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control.* 2006; 34:S29-37
91. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-seventh Informational Supplement. M100-S27, 2017. CLSI, Wayne, Pennsylvania.
92. Antimicrobial susceptibility testing of *Burkholderia cepacia* complex. [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi: 20 Kasım 2018]. Erişim adresi: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/BCC_susceptibility_testing_130719.pdf
93. Garcia BA, Carden JL, Goodwin DL, Smith TA, Gaggar A, Leon K, ve ark. Implementation of a successful eradication protocol for *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis patients. *BMC Pulm Med.* 2018; 14;18(1):35.
94. Doern CD. Doern CD. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J Clin Microbiol.* 2014;52(12):4124-8.
95. Rhodes KA, Schweizer HP. Antibiotic Resistance in *Burkholderia* Species. *Drug Resist Updat.* 2016;28:82-90.
96. Olaitan, A. O, Morand, S, and Rolain, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 2014; 5:643.
97. Poirel, L, Rodriguez-Martinez, J. M, Plesiat, P, and Nordmann, P. Naturally occurring class A beta-lactamases from the *Burkholderia cepacia* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53, 876–882.
98. Li, X. Z, Plésiat, P, and Nikaido, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015; 28, 337–418.
99. Tseng, S. P, Tsai, W. C, Liang, C. Y, Lin, Y. S, Huang, J. W, Chang, C. Y, ve ark. The contribution of antibiotic resistance mechanisms in clinical *Burkholderia cepacia* complex isolates: an emphasis on efflux pump activity. *PLoS ONE.* 2014; 9:e104986.
100. Gautam V, Shafiq N, Singh M, Ray P, Singhal L, Jaiswal NP, ve ark. Clinical and in vitro evidence for the antimicrobial therapy in *Burkholderia cepacia* complex infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(5):629-63.
101. Lu DC, Chang SC, Chen YC, Luh KT, Lee CY, Hsieh WC. *Burkholderia cepacia* bacteremia: a retrospective analysis of 70 episodes. *J Formos Med Assoc* 1997;96:972–8.

102. Avgeri SG, Matthaïou DK, Dimopoulos G, Grammatikos AP, Falagas ME. Therapeutic options for *Burkholderia cepacia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review of the clinical evidence. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(5):394-404
103. Chernish RN, Aaron SD. Approach to resistant gram-negative bacterial pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2003;9:509-15.
104. Van Dalem A, Herpol M, Echahidi F, Peeters C, Wybo I, De Wachter E, Vandamme P, Piérard D. In vitro susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients to ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 27;62(9).
105. Mazer DM, Young C, Kalikin LM, Spilker T, LiPuma JJ. In vitro activity of ceftolozane-tazobactam and other antimicrobial agents against *Burkholderia cepacia* complex and *Burkholderia gladioli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;24;61(9).
106. MLST of *Burkholderia cepacia* complex [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi: 01 Ağustos 2018]. Erişim adresi: <https://pubmlst.org/bcc/info/protocol.shtml>
107. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012 Apr 20;(62).
108. Query sequences - *Burkholderia cepacia* complex locus/sequence definitions database [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi: 01 Ağustos 2018]. Erişim adresi: https://pubmlst.org/bigddb?db=pubmlst_bcc_seqdef&page=alleleQuery&table=sequences
109. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*. 2011; 30;(47).
110. Manno G, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Vandamme P, Lorini R, Minicucci L, et al. Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cenocepacia* strains, among patients attending an Italian Cystic Fibrosis Center. *J Clin Microbiol*. 2014;42(4):1491-7.
111. Murray, S, Charbeneau, J, Marshall, B. C, and LiPuma, J. J. Impact of *Burkholderia* infection on lung transplantation in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 15;178(4):363-71.
112. Alby K, Gilligan PH, Miller MB. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry platforms for the identification of gram-negative rods from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2013;51(11):3852-4.
113. Fehlberg LCC , Andrade LHS , Assis DM , Pereira RHV , Gales AC , Marques EA . Performance of MALDI-TOF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. *Diagn Micr Infect Dis* 2013; 77 (2):126-8 .

114. Kenna DTD, Lilley D, Coward A, Martin K, Perry C, Pike R, ve ark. Prevalence of *Burkholderia* species, including members of *Burkholderia cepacia* complex, among UK cystic and non-cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol.* 2017;66(4):490-501
115. Gautam V, Singhal L, Ray P. *Burkholderia cepacia* complex: beyond pseudomonas and acinetobacter. *Indian J Med Microbiol.* 2011;29(1):4-12.
116. Lipuma JJ. Update on the *Burkholderia cepacia* complex. *Curr Opin Pulm Med.* 2005;11(6):528-33.
117. Ong KS, Aw YK, Lee LH, Yule CM, Cheow YL, Lee SM. *Burkholderia paludis* sp. nov, an Antibiotic-Siderophore Producing Novel *Burkholderia cepacia* Complex Species, Isolated from Malaysian Tropical Peat Swamp Soil. *Front Microbiol.* 2016;21;7:2046
118. Baldwin, A, Mahenthiralingam, E, Thickett, K.M, Honeybourne, D, Maiden, M.C, Govan, J.R, ve ark. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43,4665–4673.
119. Spilker, T, Baldwin, A, Bumford, A, Dowson, C.G, Mahenthiralingam, E, LiPuma, JJ. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47, 2607–2610.
120. Vanlaere, E, Baldwin, A, Gevers, D, Henry, D, De Brandt, E, Lipuma, J.J, ve ark. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009; 59, 102–111.
121. Gevers, D, Cohan, F.M, Lawrence, J.G, Spratt, B.G, Coenye, T, Feil, E.J, ve ark. Opinion: re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3, 733–739.
122. LiPuma JJ, Dulaney BJ, McMenamin JD, Whitby PW, Stull TL, Coenye T, ve ark. Development of rRNA-based PCR assays for identification of *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37, 3167–3170.
123. Segonds, C, Heulin, T, Marty, N, Chabanon, G. Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37, 2201–2208.
124. Fiore, A, Laevens, S, Bevivino, A, Dalmastri, C, Tabacchioni, S, Vandamme, P, Chiarini, L. *Burkholderia cepacia* complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy. *Environ. Microbiol.* 2001; 3, 137–143.
125. Vermis, K, Vandekerckhove, C, Nelis, H.J, Vandamme, P.A. Evaluation of restriction fragment length polymorphism analysis of 16SrDNA as a tool for genomovar characterisation within the *Burkholderia cepacia* complex. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002; 214, 1–5.

126. Mahenthiralingam, E, Bischof, J, Byrne, SK, Radomski, C, Davies, J.E, Av-Gay, Y, ve ark. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. J. Clin. Microbiol. 2000; 38, 3165–3173.
127. Vanlaere E, Lipuma JJ, Baldwin A, Henry D, De Brandt E, Mahenthiralingam E, ve ark. *Burkholderia latens* sp. nov, *Burkholderia diffusa* sp. nov, *Burkholderia arboris* sp. nov, *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov, novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008; 58, 1580– 1590.
128. Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, and Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. FEMS Microbiol. Rev. 2009; 33, 376–393.
129. Patil P. P, Mali S, Midha S, Gautam V, Dash L, Kumar S, ve ark. Genomics reveals a unique clone of *Burkholderia cenocepacia* harboring an actively excising novel genomic island. Front. Microbiol. 2017; 8:590.
130. Malešević M, Vasiljević Z, Sovtić A, Filipić B, Novović K, Kojić, M, ve ark. Virulence traits associated with *Burkholderia cenocepacia* ST856 epidemic strain isolated from cystic fibrosis patients. Antimicrob. Resist. Infect. Control. 2017; 6, 57.
131. Gislason AS, Choy M, Bloodworth RA, Qu W, Stietz MS, Li X, ve ark. Competitive growth enhances conditional growth mutant sensitivity to antibiotics and exposes a two-component system as an emerging antibacterial target in *Burkholderia cenocepacia*. Antimicrob. Agents Chemother. 2017; 61:e00790- 16.
132. Drevinek, P, Mahenthiralingam, E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. Clin. Microbiol. Infect. 2010; 16, 821–830.
133. Reik R, Spilker T, Lipuma JJ. Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2005; 43:2926-2928.
134. Brisse S, Cordevant C, Vandamme P, Bidet P, Loukil C, Chabanon G, ve ark. Species distribution and ribotype diversity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from French patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2004; 42:4824-4827.
135. Scoffone VC, Chiarelli LR, Trespidi G, Mentasti M, Riccardi G, Buroni S. *Burkholderia cenocepacia* infections in cystic fibrosis patients: Drug resistance and therapeutic approaches. Front Microbiol. 2017; 22;8:1592.
136. Canadian Cystic Fibrosis Society Patient Registry Annual Data report 2015. [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi: 20 Kasım 2018]. Erişim adresi: <https://www.cysticfibrosis.ca/uploads/Registry%20Report%202015/2015%20Registry%20Annual%20Report%20EN.pdf>

137. Agodi A, Mahenthiralingam E, Barchitta M, Gianninò V, Sciacca A, Stefani S. *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: prevalence, epidemiology, and genomovar status. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2891–2896
138. Cunha MV, Pinto-de-Oliveira A, Meirinhos-Soares L ve ark. Exceptionally high representation of *Burkholderia cepacia* among *B. cepacia* complex isolates recovered from the major Portuguese cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol* 2007;45:1628–1633
139. Nørskov-Lauritsen N, Johansen HK, Fenger MG ve ark. Unusual distribution of *Burkholderia cepacia* complex species in Danish cystic fibrosis clinics may stem from restricted transmission between patients. *J Clin Microbiol* 2010; 48:2981–2983.
140. Drevinek P, Cinek O, Melter J, Langsadt L, Navesnakova Y, Vavrova V. Genomovar distribution of the *Burkholderia cepacia* complex differs significantly between Czech and Slovak patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 2003;52:603–604
141. Jones AM, Dodd ME, Govan JR, Barcus V, Doherty CJ, Morris J, Webb AK. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax.* 2004 Nov;59(11):948-51
142. Yurdakul P, Ergünay K, Yalçın E, ve ark. Kistik fibrozis hastalarında *Burkholderia cepacia* complex izolasyonu ve tanımlanması. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40(4): 301-6.
143. Gautam V, Patil PP, Kumar S, Midha S, Kaur M, Kaur S ve ark. Multilocus sequence analysis reveals high genetic diversity in clinical isolates of *Burkholderia cepacia* complex from India. *Sci Rep.* 2016 ; 21;6:35769.
144. Voronina OL, Kunda M, Ryzhova N, ve ark. *Burkholderiales* order microorganisms and cystic fibrosis in Russia. *BMC Genomics.* 2018; 19(Suppl 3): 74
145. Wong Y. C, Abd El Ghany M, Naeem R, Lee K. W, Tan Y. C, Pain A, ve ark. Candidate essential genes in *Burkholderia cenocepacia* J2315 identified by genome-wide TraDIS. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1288 10.3389
146. Lipuma JJ. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(2):299-322
147. Coenye T, Spilker T, Van Schoor A, LiPuma JJ, Vandamme P. Recovery of *Burkholderia cenocepacia* strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. *Thorax.* 2004;59(11):952-4.
148. Campana, S, Taccetti, G, Ravenni, N, Favari, F, Cariani, L, Sciacca, A, ve ark. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43,5136–5142.

149. Martina P, Bettiol M, Vescina C, Montanaro P, Mannino MC, Prieto CI, ve ark. Genetic diversity of *Burkholderia contaminans* isolates from cystic fibrosis patients in Argentina. J Clin Microbiol. 2013; 51:339-344.
150. Medina-Pascual MJ, Valdezate S, Carrasco G, Villalón P, Garrido N, Saéz-Nieto JA. Increase in isolation of *Burkholderia contaminans* from Spanish patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Infect. 2015; 21:150-156.
151. Lupo A, Isis E, Tinguely R, Endimiani A. Clonality and antimicrobial susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex isolates collected from cystic fibrosis patients during 1998- 2013 in Bern, Switzerland. New Microbiol. 2015; 38:281-288
152. Caraher E, Reynolds G, Murphy P, McClean S, Callaghan M. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006; 26: 213–216.
153. Schwab U, Abdullah LH, Perlmutter OS, Albert D, Davis CW, Arnold RR, ve ark. Localization of *Burkholderia cepacia* complex bacteria in cystic fibrosis lungs and interactions with *Pseudomonas aeruginosa* in hypoxic mucus. Infect Immun. 2014;82(11):4729-45.
154. Caraher E, Duff C, Mullen T, Mc Keon S, Murphy P, Callaghan M, ve ark. Invasion and biofilm formation of *Burkholderia dolosa* is comparable with *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*. J Cyst Fibros. 2007;6(1):49-56.
155. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. Pathogens. 2013; 13;2(2):288-356.
156. Mishra SK, Basukala P, Basukala O, Parajuli K, Pokhrel BM, Rijal BP. Detection of biofilm production and antibiotic resistance pattern in clinical isolates from indwelling medical devices. Curr Microbiol. 2015;70(1):128-34.
157. Ku NS, Han SH, Kim CO, Baek JH, Jeong SJ, Jin SJ, ve ark. Risk factors for mortality in patients with *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia. Scand J Infect Dis. 2011;43(10):792-7.
158. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. In vitro activity of ceftazidime, ciprofloxacin, meropenem, minocycline, tobramycin and trimethoprim/sulfamethoxazole against planktonic and sessile *Burkholderia cepacia* complex bacteria. J Antimicrob Chemother. 2009;64(4):801-9.
159. Dales L, Ferris W, Vandemheen K, ve ark. Combination antibiotic susceptibility of biofilm-grown *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28: 1275-1279.
160. Papp-Wallace KM, Becka SA, Taracila MA, Zeiser ET, Gatta JA, LiPuma JJ, ve ark. Exploring the role of the omega-loop in the evolution of ceftazidime resistance in the PenA beta-lactamase from *Burkholderia multivorans*, an

- important cystic fibrosis pathogen. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(2):e01941-16.
161. Abbott FK, Milne KE, Stead DA, Gould IM. Combination antimicrobial susceptibility testing of *Burkholderia cepacia* complex: significance of species. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(5):521-527.
 162. Rose H, Baldwin A, Dowson CG, Mahenthiralingam E. Biocide susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63(3): 502–510.
 163. Dentini P, Marson FAL, Bonadia LC, Bertuzzo CS, Ribeiro AF, Levy CE, et al. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis in a Brazilian reference center. *Med Microbiol Immunol*. 2017;206(6):447-461.
 164. Duan J, Kang J, Han T, Ma Y, Guo Q. Prevalence of hospital acquired *Burkholderia cepacia* infection and its antimicrobial susceptibility in a Chinese hospital. *Pak J Pharm Sci*. 2017; 30(2):551–553
 165. Dizbay M, Tunccan OG, Sezer BE, Aktas F, Arman D. Nosocomial *Burkholderia cepacia* infections in a Turkish university hospital: a five-year surveillance. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3(4): 273-7.
 166. Regan KH, Bhatt J. Eradication therapy for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 2;11:CD009876.
 167. Tamma PD, Fan Y, Bergman Y, Sick-Samuels AC, Hsu AJ, Timp W, et al. Successful Treatment of Persistent *Burkholderia cepacia* Complex Bacteremia with Ceftazidime-Avibactam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 27;62(4).
 168. Zhou J, Chen Y, Tabibi S, Alba L, Garber E, Saiman L. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007; 51, 1085-1088.
 169. Bonacorsi S1, Fitoussi F, Lhopital S, Bingen E. Comparative in vitro activities of meropenem, imipenem, temocillin, piperacillin, and ceftazidime in combination with tobramycin, rifampin, or ciprofloxacin against *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(2):213-7.



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin **Turnitin**'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Havva Ozlem Altay Akisoglu
Ödev başlığı:	ozlem tez
Gönderi Başlığı:	ozlem tez 2
Dosya adı:	tez_taslak5_printed_-_turnitin.doc
Dosya boyutu:	1.87M
Sayfa sayısı:	74
Kelime sayısı:	16,745
Karakter sayısı:	117,808
Gönderim Tarihi:	29-Kas-2018 01:57 AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	1046682792



Ek-2 Turnitin Orjinallik Raporu Ekran Görüntüsü

ORIJINALLIK RAPORU			
%9	%5	%7	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
1	O. Akisoglu, S. Saricam, H.K. Mustak, G. Hasçelik. "Multilocus sequence analysis and synergy tests of Burkholderia species isolated from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients", International Journal of Infectious Diseases, 2018 Yayın		%1
2	www.mikrobiyolbul.org İnternet Kaynağı		%1
3	Submitted to Mehmet Akif Ersoy Aniversitesi Öğrenci Ödevi		%1
4	Matthias Marschal, Johanna Bachmaier, Ingo Autenrieth, Philipp Oberhettinger, Matthias Willmann, Silke Peter. "Evaluation of the Accelerate Pheno System for Fast Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing from Positive Blood Cultures in Bloodstream Infections Caused by Gram-Negative Pathogens", Journal of Clinical Microbiology, 2017		<%1

ÖZGEÇMİŞ

Havva Özlem ALTAY AKISOĞLU, M.D.

Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanı

e-posta: hoaltay@gmail.com

Doğum tarihi: 25/03/1983

Doğum Yeri: Bursa, TÜRKİYE

İş Adresi: Dr. Sami Ulus Doğum ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Birimi, Ankara.

Telefon: +90.312.305 6072

Eğitim:

- Doktora Eğitimi: Hacettepe Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara (2013- Halen)
- Uzmanlık Eğitimi: Hacettepe Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara (2010-2014)
- Tıp Fakültesi: Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara (2000-2008)

Profesyonel deneyim:

- Dr. Sami Ulus Doğum ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Birimi, Ankara (2015- Halen)
- Kastamonu Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kastamonu (2014-2015) (Zorunlu Devlet Hizmeti)

YURT DIŞI ARAŞTIRMA DENEYİMİ:

- **9 ay süreyle Konuk Araştırmacı;** Science for Life Laboratories, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, İsveç

Üye Olduğu Topluluklar:

1. Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlığı Derneği (KLIMUD)

- Başkan, KLIMUD Genç Uzmanları Komitesi (2015 - 2018)

- Başkan, KLIMUD Araştırma Görevlisi Çalışma Komitesi (2013-2015)

2. Ankara Mikrobiyoloji Derneği

- Denetim kurulu üyesi (2014-2016)

3. Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (ESCMID)

4. Amerikan Mikrobiyoloji Derneği (ASM)

Ödüller:

- Pfizer 19. Bilimsel Araştırma Yarışması, 3. En İyi Araştırma Ödülü: Türkiye'de Yetişkinlerde İnvaziv Pnömonokok Hastalığının Sebep Olduğu Streptococcus pneumoniae'nin Serotip Dağılımı ve Antimikrobiyal Duyarlılığı, 2005-2011; 6. Ulusal Aşı Sempozyumu, 21-25 Ekim 2015, Ankara, Türkiye.

Burslar:

- 2214-A TÜBİTAK Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu (2017)

14 - ESCMID Yaz Okulu KLIMUD Katılım Bursu, 4 - 11 Temmuz 2015, İstanbul, Türkiye

Konferanslar:

- **Davetli Konuşmacı:** Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında İnsan Gücü: Araştırma Görevlileri Perspektifinden, 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 9 - 13 Kasım 2013, Antalya

Tez (Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanı olarak):

- Universal Primer Kullanılarak Febril Hastalarda Bakteriyeminin Hızlı Tespiti, 2014

Makaleler:

- Karadağ-Öncel E, Gönc N, Altay O, Cengiz AB, Ozon A, Pınar A, Ceyhan M, Alikasifoğlu A, Akyon Y, Kandemir N, Özsürekcı Y, Kara A. Prevalence of nasal carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in children with diabetes mellitus: Trends between 2005 and 2013. Am J Infect Control. 2015 1 Eylül; 43 (9): 1015-7
- Tanır G, Ozsurekci Y, Lucidarme J, Yaşar Durmuş S, Lekshmi A, Akisoglu Ö, Aycan AE, Borrow R, Ceyhan M. Neisseria meningitidis Serogroup X ST-5799 (ST-22 complex) in Turkey: A unique pediatric case. Hum Vaccin Immunother. 2018 Jan 2;14(1):209-212.

Poster Sunumları:

- Haşçelik G, Altay O, Karacan N, Özdal Salar M, Mustak HK. Klinik İzolatlarda Viridans Grup Streptokokların Belirlenmesi: Uçuş Kütle Spektrometre Sistemlerinin İki Matris Destekli Lazer Desorpsiyon-İyonlaşma Süresinin Karşılaştırılması ve Konvansiyonel Bir Fenotipik Yöntem. 115. Genel Kurul, Amerikan Mikrobiyoloji Derneği, 30 Mayıs - 2 Haziran 2015, Louisiana, ABD
- Altay O, Pınar A, Ortaç E, Topeli A, Özkuyumcu C. Evrensel Primer Kullanılarak Febril Hastalarda Hızlı Bakteriyemi Tespiti, 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 18-22 Kasım 2015, Antalya