



T.C.

BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***BURKHOLDERIA CEPACIA* KOMPLEKS BAKTERİLERİN
GIDALARDAKİ VARLIĞI VE HALK SAĞLIĞI AÇISINDAN
ÖNEMİ**

Biyolog Emel ALIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Özen YURDAKUL

BURDUR-2023

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***BURKHOLDERIA CEPACIA* KOMPLEKS BAKTERİLERİN
GIDALARDAKİ VARLIĞI VE HALK SAĞLIĞI AÇISINDAN
ÖNEMİ**

Biyolog Emel ALIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Özen YURDAKUL

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0685-YL-20 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2023

TEŞEKKÜR

Çalışmamın tasarlanıp hazırlanmasında, bilgi ve birikimini benimle paylaşarak özgün fikirleriyle yolumu aydınlatan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Özen YURDAKUL'a, iyiliğin ve bilimin paylaşıldıkça geliştiğini, çalışan kişiye yardımcı olmanın doğal bir seyir olduğunu tüm içtenliği ile bana hissettiren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Meral Dilara ÖĞÜNÇ'e, laboratuvar çalışmalarımda bana her konuda destek olup paylaşımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Erdi ŞEN'e, bugüne kadar hiçbir fedakarlıktan kaçınmayıp her zaman yanımda olan, güven ve saygısıyla eğitim hayatımda özgür ve sağlam adımlar atmamı sağlayan kıymetli babam Dilaver ALIÇ'a, annem Mülkiye ALIÇ'a ve ablam Özlem ALIÇ'a, bu süreçte manevi destekleriyle yanımda olan değerli dostlarıma, iş arkadaşlarıma ve tüm güzel insanlara en içten teşekkürlerimi sunuyorum.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI.....	i
KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. <i>B. cepacia</i> Kompleksi'nin Tarihçesi ve Sınıflandırmadaki Yeri.....	4
2.2. <i>B. cepacia</i> Kompleksi'nin Genel Özellikleri.....	8
2.3. <i>B. cepacia</i> Kompleksi'nin Virülans ve Patogenezi	10
2.4. <i>B. cepacia</i> Kompleksi'nin Epidemiyolojisi ve Gıdalarda Varlığı.....	12
2.5. <i>B. cepacia</i> Kompleksi'nin Laboratuvar Tanısı.....	14
2.5.1. İzolasyonu	14
2.5.2. Tanımlanması.....	15
2.6. <i>B. cepacia</i> Kompleksi Türlerinden İleri Gelen Enfeksiyonlar	16
2.7. <i>B. cepacia</i> Kompleksi'nin Tedavisi	17
3. MATERYAL VE METOT	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Araştırmada Kullanılan Malzemeler	18
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Suşlar	19
3.2. Metot.....	19
3.2.1. Örneklerin Toplanması	19
3.2.2. Örneklerden Bakterilerin Kültürel İzolasyonu	20
3.2.2.1. Süt ve Süt Ürünleri.....	20
3.2.2.2. Su Örnekleri	22
3.2.3. Bakterilerin Rutin Yöntemlerle Tanımlanması.....	23
3.2.3.1. Gram Boyama	23
3.2.3.2. Katalaz Testi.....	24

3.2.3.3. Oksidaz Testi	25
3.2.3.4. Karbonhidrat Fermentasyon Testi.....	25
3.2.3.5. Nitrat Redüksiyon Testi.....	26
3.2.4. Bakterilerin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması	27
3.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu	27
3.2.4.2. PZR Karışımlarının Hazırlanması ve Amplifikasyonların Elde Edilmesi.....	27
3.2.4.3. PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi.....	30
3.2.5. <i>Burkholderia cepacia</i> 'nın Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi	30
3.2.6. <i>Burkholderia cepacia</i> 'nın Antibiyotik Duyarlılıklarının İncelenmesi 31	
4. BULGULAR	33
4.1. Kültürel İzolasyon Bulguları.....	33
4.2. İdentifikasyon Bulguları	35
4.3. Moleküler Analiz Bulguları.....	39
4.4. Çalışmada Kullanılan <i>B. cepacia</i> Suşunun Biyofilm Sonuçları	41
4.5. Çalışmada Kullanılan <i>B. cepacia</i> Suşunun Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları.....	41
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ.....	53

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.** *Burkholderia cepacia* kompleks türlerinde 116 genomunun yeniden 7 sınıflandırılması ile oluşan, olası en geniş filogenetik ağaç 7
- Şekil 3.1.** BCSA besiyerinde *Burkholderia cepacia*'nın koloni görüntüsü, koyun 19 kanlı agar besiyerinde *Burkholderia cepacia*'nın koloni görüntüsü 19
- Şekil 3.2.** Süt ürünlerinde ön zenginleştirme işlemi, süt örneklerinde ön 20 zenginleştirme işlemi
- Şekil 3.3.** BCSA besiyerinde üreyen koloniler 21
- Şekil 3.4.** Süt örneklerinde kültürel ekim şeması 21
- Şekil 3.5.** Membran filtre kağıtları kullanılarak yapılan sudaki ön zenginleştirme 22 işlemi
- Şekil 3.6.** Otoklavlanmış tüplerdeki BCSA besiyeri, dökme plak yöntemine göre 23 çalışılan petri görüntüleri, BCSA besiyerinde üreyen şüpheli *Burkholderia cepacia* kolonileri, pembe zemin üzerinde görüntülenen koloniler
- Şekil 3.7.** Süt örneği içerisindeki Gram negatif basiller 24
- Şekil 3.8.** Katalaz pozitif, katalaz negatif 24
- Şekil 3.9.** Pozitif suş *Burkholderia cepacia*'nın karbonhidrat fermentasyon testi 25 sonuçları, Sarı renge dönüşen besiyerinde gaz kabarcıkları oluşumu; pozitif reaksiyon, Rengi değişmeyen besiyeri; negatif reaksiyon, Örneklerin karbonhidrat fermentasyon testi sonuçları
- Şekil 3.10.** Örneklerin nitrat redüksiyon testi sonuçları 26
- Şekil 3.11.** Çalışmada kullanılan *Burkholderia cepacia*'nın biyofilm görüntüsü 31
- Şekil 3.12.** Çalışmada kullanılan *Burkholderia cepacia*'nın MHA üzerinde disk 32 difüzyon test görüntüsü
- Şekil 4.1.** İdentifikasyon sonucu elde edilen izolatların dağılımı 36
- Şekil 4.2.** 16S rRNA gen primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin elektroforez jel 39 görüntüsü (M: DNA Marker, P: *Burkholderia cepacia* suşu, N: Negatif kontrol, Aşağıdan yukarı 1-34 no'lu izolatlar)
- Şekil 4.3.** *recA* gen primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin elektroforez jel 40 görüntüsü (M: DNA Marker, P: *Burkholderia cepacia* suşu, Sağdan-sola 1-18 no'lu izolatlar)
- Şekil 4.4.** *recA* gen primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin elektroforez jel 40 görüntüsü (M: DNA Marker, P: *Burkholderia cepacia* suşu, Sağdan-sola 19-32 no'lu izolatlar)
- Şekil 4.5.** *recA* gen primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin elektroforez jel 41 görüntüsü (M: DNA Marker, P: *Burkholderia cepacia* suşu, N: Negatif Kontrol, Sağdan-sola 33-34 no'lu izolatlar)

TABLULAR

Tablo 2.1. <i>Burkholderia cepacia</i> kompleksine ait türler ve genomvarları	5
Tablo 2.2. <i>Burkholderia cepacia</i> kompleksine ait türler	6
Tablo 2.3. Bcc türlerine ait mikrobiyolojik özellikler	8
Tablo 2.4. Bcc türlerine ait önemli biyokimyasal özellikler	9
Tablo 2.5. Bcc türlerinin virülans faktörleri ve fonksiyonları	11
Tablo 2.6. <i>Burkholderia cepacia</i> kompleksi türlerinin izole edildikleri kaynaklara göre dağılımları	13
Tablo 2.7. Bcc türlerinin tanımlanmasında kullanılan bazı moleküler yöntemler	16
Tablo 3.1. Analizlerde kullanılan malzeme listesi	18
Tablo 3.2. PZR analizinde kullanılan primerler, primer uzunlukları ve hedef gen bölgeleri	28
Tablo 3.3. Şüpheli izolatlar için hazırlanan PZR reaksiyon karışımı	28
Tablo 3.4. Pozitif kontrol için hazırlanan PZR reaksiyon karışımı	29
Tablo 3.5. Negatif kontrol için hazırlanan PZR reaksiyon karışımı	29
Tablo 3.6. <i>Burkholderia cepacia</i> kompleks bakterilerinde <i>recA</i> genini tespit etmek için gerekli PZR koşulları	29
Tablo 3.7. <i>Burkholderia cepacia</i> bakterilerinde 16S rRNA genini tespit etmek için gerekli PZR koşulları	29
Tablo 4.1. Toplanan örneklerin gıda türüne göre sayısal dağılımı	33
Tablo 4.2. Kültür izolasyonuna göre elde edilen izolatların sayısal dağılımı ve oranları	34
Tablo 4.3. Hücre morfolojilerine göre elde edilen izolatların sayısal dağılımı ve oranları	34
Tablo 4.4. Biyokimyasal test sonuçlarına göre elde edilen izolatların sayısal dağılımı ve oranları	35
Tablo 4.5. Şüpheli izolatların çalışılan gıda türüne göre dağılımı ve biyokimyasal test sonuçları	37
Tablo 4.6. <i>B. cepacia</i> kompleksi için belirlenen spesifik antibiyotikler ve zon çapları	41
Tablo 4.7. Çalışmada kullanılan <i>B. cepacia</i> suşunun oluşturduğu zon çapları	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bcc	<i>Burkholderia cepacia</i> Kompleksi
BCSA	<i>Burkholderia cepacia</i> Selektif Agar
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
CLSL	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute)
ÇEVRE	Doğal Çevreden Elde Edilen İzolat Sayısı
ENDÜST	Endüstriyel Kaynaktan Elde Edilen İzolat Sayısı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
I	Orta Derecede Duyarlı
KF	Kistik Fibrozisli Hastalardan Elde Edilen İzolat Sayısı
KLİNİK	KF Dışındaki Bir Klinik Enfeksiyondan Elde Edilen İzolat Sayısı
MLST	Multilokus Dizi Tiplendirmesi
R	Dirençli
S	Duyarlı

ÖZET

Burkholderia cepacia Kompleks Bakterilerin Gıdalardaki Varlığı ve Halk Sağlığı Açısından Önemi

Bu çalışma, insan sağlığı açısından ciddi enfeksiyonlara sebep olan *Burkholderia cepacia* kompleks (Bcc) bakterilerinin gıdalarda varlığının araştırılması ve gıdalara bulaşma yollarının incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, Kasım 2021-Nisan 2022 tarihleri arasında Burdur il merkezi ve çevre ilçelerindeki mandıralar, süt toplama tankerleri, halk pazarları, doğal su kaynakları ve içme kullanma sularından toplanan 270 adet gıda örneği *Burkholderia cepacia*'nın varlığı yönünden analize alınmıştır. Kültürel izolasyon ve identifikasyonları sonucunda 34 izolat *B. cepacia* şüpheli olarak tanımlanmıştır. İzolatların %11,76 (4/34)'sı çiğ inek sütü, %14,71 (5/34)'i çiğ koyun sütü, %17,65 (6/34)' çiğ keçi sütü, %55,88 (19/34)'i kaynak sularından oluşmaktadır. Peynir, yoğurt, tereyağı ve içme kullanma sularına ait örneklerden izolat elde edilmemiştir. Çalışmanın akabinde şüpheli olarak belirlenen 34 izolatın *recA* ve 16S rRNA gen bölgesine ait spesifik primerleri kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile doğrulaması yapılmıştır. PZR sonuçlarına göre tüm izolatlar negatif olarak değerlendirilmiştir. İzolatlarda *recA* ve 16S rRNA genleri saptanmamıştır. Çalışma kapsamına dahil edilen *B. cepacia* suşu, biyofilm oluşturma kapasitesi ve antibiyotik dirençlilikleri yönünden test edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, *B. cepacia* suşunun biyofilm oluşturduğu ve değerlendirilen antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Antibiyotikler arasında en yüksek duyarlılık Meropenem'de, en az duyarlılık Minocycline'de gözlenmiştir. Sonuç olarak süt, süt ürünleri ve su örneklerinde *Burkholderia cepacia*'ya rastlanmamıştır. Ancak türlerin doğada yaygın olarak bulunmaları nedeniyle gıdalarla bulaşabileceği ve enfeksiyonların oluşabileceği düşünülmektedir. Patojen bir tür olması halk sağlığı açısından risk taşımaktadır. Bu sebeple halk sağlığı adına alınacak önlemlerin daha etkili olabilmesi için *B. cepacia* kompleks türlerinin bulaş yollarının incelenmesi, insanlardaki patojenitesi ve yol açtığı sorunların bilinmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: *Burkholderia cepacia*, Kaynak suyu, PZR, Süt, Süt ürünleri

ABSTRACT

The Presence of *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria in Foods and Its Importance for Public Health

This study was carried out to investigate the presence of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) bacteria, which cause serious infections in terms of human health, in foods and to examine the ways of contamination to foods. For this purpose, 270 food samples collected from dairy farms, milk collection tankers, public markets, natural water sources and potable water in Burdur city center and surrounding counties between November 2021 and April 2022 were analyzed for the presence of *Burkholderia cepacia*. As a result of cultural isolation and identification, 34 isolates were identified as *B. cepacia* suspicious. When expressed as a percentage, 11.76% (4/34) of the isolates are raw cow's milk, 14.71% (5/34) raw sheep's milk, 17.65% (6/34) raw goat's milk, 55.88% (19/34) of it consists of spring waters. No isolates were obtained from the samples of cheese, yoghurt, butter and drinking water. After the study, 34 isolates determined as suspicious were confirmed by PCR method using specific primers belonging to the *recA* and 16S rRNA gene region. All isolates were evaluated as negative according to PCR results. *recA* and 16S rRNA genes were not detected in isolates. The *B. cepacia* strain included in the study was tested for its biofilm forming capacity and antibiotic resistance. As a result of the analysis, it was determined that the *B. cepacia* strain formed a biofilm and was sensitive to the evaluated antibiotics. Among the antibiotics, the highest sensitivity was observed in Meropenem, the least sensitivity was observed in Minocycline. As a result, *Burkholderia cepacia* were not found in milk, dairy products and water samples. However, it is thought that due to the widespread presence of the species in nature, it can be transmitted with food and infections may occur. Being a pathogenic species, it carries a risk for public health. For this reason, in order for the measures to be taken on behalf of public health to be more effective, it is necessary to examine the transmission routes of *B. cepacia* complex species, its pathogenicity in humans and the problems it causes should be known.

Keywords: *Burkholderia cepacia*, Milk, Milk products, PCR, Spring water

1. GİRİŞ

Gıda ve su tüketimi insanların beslenmesinde büyük bir öneme sahiptir. Buna bağlı olarak hijyenik açıdan uygun olmayan gıdalar tüketildiğinde gıda kaynaklı hastalıklar ve gıda enfeksiyonları oluşabilmektedir. Gıdaların mikroorganizmalarla kontaminasyonu farklı yollarla olmaktadır. Hava, su, toprak, kontamine alet-ekipmanlar ve gıda sektöründe çalışan işçiler gibi faktörlerden kontaminasyon şekillenmektedir. Bu şekilde insanlara geçen çoğu hastalık yapıcı mikroorganizmalar, uygun koşullar oluştuğunda halk sağlığını tehdit eden ciddi sorunlara yol açmaktadır (Erol, 2007).

Süt ve süt ürünleri beslenme zincirinin önemli bir basamağını oluşturmaktadır. İçerdikleri esansiyel aminoasitler, vitaminler, mineraller bakımından oldukça zengin olup günlük tüketilmesi gereken besin grubudur. İnsan beslenmesinde önemli bir yer tutan hayvansal gıdaların patojen mikroorganizmalarla kontaminasyonu sonucunda önemli gıda enfeksiyon ve intoksikasyonları görülmektedir (Erol, 2007).

Su, canlıların yaşamını devam ettirebilmeleri için gerekli doğal bir kaynaktır. Suların insan sağlığını olumsuz etkileyen mikrobiyolojik tehlikelere maruz kalması ise halk sağlığı için önemli bir risk oluşturmaktadır. Dünyada birçok insan su ile bulaşan hastalıklar nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Bu nedenle sağlıklı, içilebilir su kaynaklarına erişim ve bunların standartlara uygun bir şekilde tüketiciye ulaşması gereklidir (Terzi ve Dündar, 2020).

İnsan sağlığı açısından ciddi enfeksiyonlara sebep olan *Burkholderia cepacia* kompleks bakterileri, son zamanlarda gıdalarda tespit edilmesiyle ilgi uyandırmıştır. Hastane enfeksiyonlarından sorumlu olmasının yanında gıdalarla da insanlarda hastalık yapabilme potansiyelinin olması sonucu Bcc türlerinin önemi günümüzde giderek artmaktadır. Toprak ve suda yaygın olarak bulunması nedeniyle meyve ve sebzelere kolayca bulaşabilmektedir. Gıdalardaki varlığıyla tüm dikkatleri üzerine çeken bu bakterilerin insanlara geçişinde hayvansal ürünler, sebze ve meyveler potansiyel risk oluşturacak önemli gıdalardır. Ayrıca hayvansal ürünlerde

kontaminasyona bağlı olarak bulunması ile halk sağlığı yönünden önemi artmıştır (John ve ark., 2001).

Bcc türleri fenotipik ve genotipik olarak birbirine benzer 22 türden oluşan fırsatçı patojen bir gruptur. Çoğunlukla bağışıklığı zayıf kişilerde enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Sağlıklı bireylerde ise nadiren enfeksiyona sebep olup olgular daha çok geçici ateş yükselmesi ve hafif seyirli olarak kendini gösterir (Baylan, 2012). Bu türlerin aynı zamanda hastane ortamlarında alet-ekipman ve cihazları kontamine ederek hasta servisleri ile yoğun bakım ünitelerinde ciddi problemlere yol açtığı bilinmektedir (Liao ve ark., 2011). Başta idrar yolu enfeksiyonları olmak üzere menenjit, septisemi, pnömoni gibi birçok enfeksiyonlardan sorumludur. İncelenen epidemiyolojik çalışmalarda, hastalık oluşturan ve antibiyotik duyarlılıkları birbirinden farklı olan türleri olduğu görölmüştür. Bu sebeple Bcc bakterilerinin tür düzeyinde doğru tanımlanması oldukça önem taşımaktadır. Türlerin basit olarak tanımlanmasında fenotipik ve biyokimyasal yöntemlerin eksik kalmasından dolayı türlerin kesin tanısı için moleküler yöntemlerle doğrulama yapılması gerektiği bildirilmektedir. Bazı *Burkholderia* türlerinin insanlar dışında hayvanlarda da hastalık yaptığı görölmektedir. Özellikle *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* ilk akla gelen patojen türlerdir (Altay, 2019).

Bcc bakterileri üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında çoğunlukla hastane enfeksiyonlarından sorumlu türler üzerine yoğunlaşıldığı görölmüştür (Altay, 2019). Yapılan son epidemiyolojik çalışmalar ise *B. cepacia* bakterilerinin gıda kaynaklı bir bulaş oluşturabileceğini ve etkenin daha sonrasında gıda enfeksiyonu haline dönüşebileceğini göstermektedir. Ancak etkenin gıdalarda görölme sıklığı, gıdalarda bulaşma yolları, korunma ve kontrolü gibi konularda çalışmalar yeterli değildir (John ve ark., 2001).

Türkiye’de *Burkholderia cepacia* kompleks türlerinin gıdalardaki varlığıyla ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu çerçevede önemli gıdaların hedef alınarak incelenmesi, insanlardaki patojenitesi, yol açtığı sorunların bilinmesi ve gıda tüketiminin uygun hale getirilmesi halk sağlığı açısından son derece önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, literatürdeki birçok klinik bulgunun aksine gıdalardan izole edilen *B. cepacia* kompleks suşlarının rutin mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanarak PZR yöntemiyle doğrulanması ve elde edilen suşların biyofilm oluşumları ile antibiyotik duyarlılıkları incelenmesi amaçlanmıştır. Bir diğer amacımız ise Türkiye’de halk sağlığı adına alınacak önlemlerin daha etkili olabilmesi için *B. cepacia* kompleks türlerinin gıdalara bulaş yollarının incelenmesi, gıda enfeksiyonları yönünden oluşabilecek risklerin açıklanması ve gıda yönünden salgınların oluşabileceği akılda tutularak mikrobiyolojik bulaşmayı önleyici tedbirlerin neler olması gerektiği yönünde bilgilendirmenin yapılmasıdır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *B. cepacia* Kompleksi'nin Tarihçesi ve Sınıflandırmadaki Yeri

Bcc türleri günümüz taksonomisinde *Betaproteobacteria* sınıfı içinde *Burkholderiaceae* ailesinde yer almaktadır (Burkholder, 1950). *Burkholderia* bakterileri ilk kez 1940 yılında bitki patoloğu Walter Burkholder tarafından soğanlarda çürüme nedeni olarak izole edilmiş ve *Pseudomonas cepacia* olarak isimlendirilmesi önerilmiştir. Bu türün uzun bir zaman sadece bitki patojeni olduğu düşünülmüş ancak 1972 yılında kistik fibrozisli bir hastada fırsatçı patojen olarak tanımlanmıştır. Daha sonra, 1982 yılında 17 yaşındaki bir hastada görülmesiyle dikkatleri üzerine çekmiştir (Binnet, 2006; Horasanlı ve ark., 1997; Leitao ve ark., 2010; Mahenthiralingam ve ark., 2008; Şener, 2002).

Pseudomonas cepacia türü, 1942 yılında *Betaproteobacteria* sınıfında *Burkholderiales* takımıyla ve *Burkholderiaceae* ailesi ile Burkholder'in çalışmalarına ithafen *Burkholderia cepacia* olarak yeniden isimlendirilmiştir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda rRNA Group II *Pseudomonadlar* altında sınıflanan *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomona spickettii*, *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pseudomallei* ve *Pseudomonas caryophylli* olmak üzere yedi türü yeni bir cinse aktararak yeni cinsin adını *Burkholderia* olarak tanımlamışlardır. Bazı *Pseudomonas* türleri *Burkholderia* cinsine geçerken *Burkholderia pickettii* ve *Burkholderia solanacearum* gibi türler ise *Ralstonia* cinsine eklenmiştir (Yabuuchi ve ark., 1995).

Araştırmacılar, 1990'lu yıllardan itibaren geleneksel tanımlama yöntemlerinin yanında moleküler yöntemlerin uygulanmasına bağlı olarak farklı ekolojik kaynaklardan izole ettikleri *B. cepacia* izolatlarının aralarında belirgin bir heterojeniteye sahip olduklarını belirtmişlerdir (Henry ve ark., 2001). Vandamme ve ark. (1997) kistik fibrozisli hastalardan, klinik örneklerden ve çevreden izole ettikleri *B. cepacia* izolatları arasındaki çeşitliliği ortaya çıkarmak için polifazik taksonomik bir çalışma yürütmüştür. Bu çalışmada izolatlar, tüm hücre protein elektroforezi, tüm hücre yağ asidi metil ester analizleri ve DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyon

yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiş ve bu bakterilerin en az beş ayrı genomovara ait oldukları bildirilmiştir. Bu türlere topluca *Burkholderia cepacia* kompleks isimlendirilmesi yapılmıştır. Sonraki yıllarda yapılan taksonomik çalışmalarda, yeni üyelerin ortaya çıkmasıyla beraber Bcc'ye ait 4 genomovar üyesi daha eklenmiştir (Sfeir, 2018; Vermis ve ark., 2002). Eklenen türler ve genomovaları Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. *Burkholderia cepacia* kompleksine ait türler ve genomovaları(Sfeir, 2018; Vermis ve ark., 2002).

Türü	Genomovarı
<i>Burkholderia cepacia</i>	genomovar I
<i>Burkholderia multivorans</i>	genomovar II
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	genomovar III
<i>Burkholderia stabilis</i>	genomovar IV
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	genomovar V
<i>Burkholderia dolosa</i>	genomovar VI
<i>Burkholderia ambifaria</i>	genomovar VII
<i>Burkholderia anthina</i>	genomovar VIII
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	genomovar IX

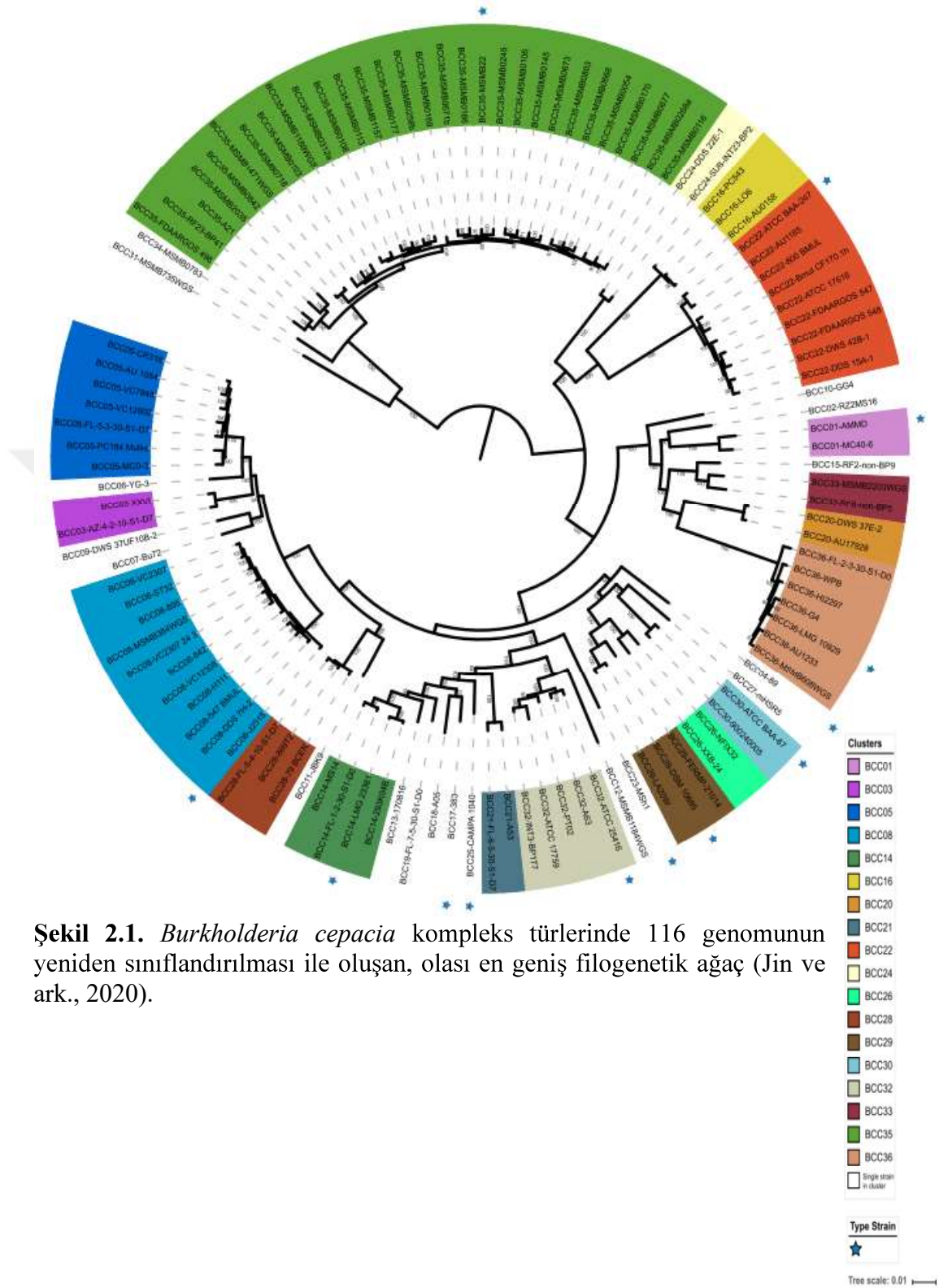
Daha sonraki yıllarda türe özgü PZR testi, ribotiplendirme, PZR ile çoğaltılmış gen fragmanlarının restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi analizi ve tRNA profillemesi gibi moleküler yöntemlerin Bcc'nin tanımlanması ve sınıflandırılması açısından yararlı olduğu düşünülmüştür. Ancak düzenli olarak türlerde yeni üyelerin ortaya çıkmasıyla bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin yeniden değerlendirilmesini gerektirmiştir (Rosenberg ve ark., 2014). Son yıllarda ortaya çıkan yeni moleküler yöntemler arasında *recA* geni ve multilokus dizileme tipli yöntemler ile tanımlama ve sınıflandırma amaçlı kullanılması sonucunda Bcc türlerinin genomik olarak yakın ilişkili en az 20 tür içerdiği anlaşılmıştır (Bach ve ark., 2017). Bcc'ye ait türlerin listesi Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Jin ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada Bcc'ye ait birbiriyle yakın ilişkili türler karşılaştırılıp 16S rRNA, *recA* geni, *hisA* geni kullanılarak oluşturulan tanı yöntemleri ile MLSA yönteminin türleri sınıflandırmada yeterli olmadığı görülmüştür. Daha sonra Bcc türlerini, tüm genom verilerini kullanarak 36 kümeye

ayırımıdır. Bu 36 kümeden 22 türü uygun düzeltmelerle tanımlayıp kalan 14 kümenin potansiyel yeni bir tür olarak yeniden sınıflandırılması gerektiği sonucuna ulaşmışlardır. Tanımlanan 22 tür Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. *Burkholderia cepacia* kompleksine ait türler (Bach ve ark., 2017).

1. <i>Burkholderia ambifaria</i>	13. <i>Burkholderia pseudomultivorans</i>
2. <i>Burkholderia anthina</i>	14. <i>Burkholderia pyrrocinia</i>
3. <i>Burkholderia arboris</i>	15. <i>Burkholderia seminalis</i>
4. <i>Burkholderia cenocepacia</i>	16. <i>Burkholderia stabilis</i>
5. <i>Burkholderia cepacia</i>	17. <i>Burkholderia ubonensis</i>
6. <i>Burkholderia contaminans</i>	18. <i>Burkholderia vietnamiensis</i>
7. <i>Burkholderia diffusa</i>	19. <i>Burkholderia stagnalis</i>
8. <i>Burkholderia dolosa</i>	20. <i>Burkholderia territorii</i>
9. <i>Burkholderia lata</i>	21. <i>Burkholderia puraquae</i>
10. <i>Burkholderia latens</i>	22. <i>Burkholderia catarinensis</i>
11. <i>Burkholderia metallica</i>	23. <i>Burkholderia paludis</i>
12. <i>Burkholderia multivorans</i>	



Şekil 2.1. *Burkholderia cepacia* kompleks türlerinde 116 genomun yeniden sınıflandırılması ile oluşan, olası en geniş filogenetik ağaç (Jin ve ark., 2020).

2.2. *B. cepacia* Kompleksi'nin Genel Özellikleri

Burkholderia cepacia kompleksi Gram negatif, basil formunda, aerobik, (1,6-3,2) µm uzunluğunda, hareketli bakterilerdir. Oksidaz reaksiyonu pozitif olmasının yanında türden türe göre farklılık göstererek çoğunlukla zayıf pozitiflik vermektedir (Baltimore, 2006). Katalaz testi pozitif, nitrat redüksiyon testi negatif olan Bcc bakterileri glikoz, galaktoz, mannitol, inositol, sorbitol ve gliserolü tek karbon kaynağı olarak kullanmaktadır (Gillis ve ark., 1995). Bcc türlerinin mikrobiyolojik özellikleri Tablo 2.3'te, biyokimyasal özellikleri Tablo 2.4'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Bcc türlerine ait mikrobiyolojik özellikler (Baylan, 2012).

Özellikler	Sonuç	Özellikler	Sonuç
Oksidaz	+	DNAz	-
Katalaz	+	İndol	-
Piyosiyenin oluşturma	+/-	Spor oluşturma	-
Floresans oluşturma	+	N ₂ gaz	-
H ₂ S	-	Glikozdan asit oluşturma*	+
Mac Conkey'de üreme	+/-	Maltozdan asit oluşturma*	+/-
BCSA ¹ 'da üreme	+	Laktozdan asit oluşturma*	+/-
42°C'de üreme	-/+	Ksilozdan asit oluşturma*	+/-
Üreaz aktivitesi	+/-	Mannitolden asit oluşturma*	+/-
Sarı pigment oluşumu	+/-	Sükrozdan asit oluşturma*	+/-
Kahverengi pigment oluşumu	-	Adonitoldan asit oluşturma*	+/-
Arjinin dehidrolaz	-	PNPG ² veya ONPG ³	+/-
Lizinde karboksilaz	+	Nitrati nitrite indirgeme	-
Ornitinde karboksilaz	-/+	Eskülin hidrolizi	+/-
Jelatini eritme	+/-	Glukoz/laktoz fermentasyonu	-
Hareket	+		

¹: *Burkholderia cepacia* selektif agar

²: p-nitrofenil-beta-D-glikozid

³: o-nitrofenil-beta-D-galaktopiranozid

*: Oksidasyon testi sonuçları yedi gün inkübasyondan sonra kaydedilmiştir.

+: Suşların %85'inden fazlası pozitif

-: Suşların %85'inden fazlası negatif

Tablo 2.4. Bcc türlerine ait önemli biyokimyasal özellikler (Rosenberg ve ark., 2014).

	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	+
Maltozdan asit üretimi	+	+	+	V	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Laktozdan asit üretimi	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	-
D-ksilozdan asit üretimi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	V	+
Sütükrozdandan 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.cenopacia*, 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.pyrocinia*, Bse *B.seminalis*, Bst *B.stabilis*, Bub *B.ubonensis*, Bivi *B.vietnamiensis*, Bgl *B.gladioli*

2.3. *B. cepacia* Kompleksi'nin Virülans ve Patogenezi

Bcc türleri, invaziv özellikte patojen bakterilerdir (Baylan, 2012). Son yıllarda bu bakterilerin virülans faktörleri üzerine birçok bilimsel araştırmalar yapılmış ancak patojenitesi hala açıklığa kavuşturulamamıştır. Ancak immün yetmezlik ve kistik fibrozistin patogenezinde önemli rol oynadıkları sanılmaktadır (Leitao ve ark., 2010; Şener, 2002). Bakterilerin klinik bulguları virülans faktörlerine, türlerine ve kişilerin bağışıklık cevabına bağlı olarak değişmektedir (Altay, 2019). Literatür taramalarında ise Bcc türlerinin gıda enfeksiyonları yönünden değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

B. cepacia kompleks bakterilerinin en önemli virülans faktörlerinden biri çevresel etkilere ve konağın bağışıklık sistemine karşı korunmak için biyofilm tabakası oluşturmalarıdır. Geliştirdikleri direnç mekanizması ile antibiyotiklere karşı daha duyarsız oldukları gösterilmiştir (Leitao ve ark., 2010).

Bcc türlerin patojenitesinde yüzey yapıları, ekzopolisakkarit biyosentezi, ortamdaki demiri kullanabilme ve hareket edebilme yetenekleri, protein sekresyon sistemleri, antibiyotik direnç mekanizmaları ve oksidatif stres dirençleri gibi diğer önemli virülans faktörleri de dikkat çekmektedir (Altay, 2019). Bcc türlerine ait virülans faktörleri ve fonksiyonları Tablo 2.5'te gösterilmiştir.

Tablo 2.5. Bcc türlerinin virülans faktörleri ve fonksiyonları (Altay, 2019).

Virülans Faktörü	Etki Mekanizması
Yüzey yapıları	Bakterinin hareketi, akciğer yüzeyine adherensin artırılması ve akciğer epitel hücrelerine invazyonu
Lipopolisakkarit	Antibiyotiklerin bağlanmasını inhibe etmekte ve bakteriyel enfeksiyonların kalıcı olmasını sağlama
Flajel, pili, 22 kDa, Adezinler	Hareket edebilme yeteneği ve konakçı hücrelere patojenlerin girmesini sağlama
Hücre içinde hayatta kalma	Makrofajlarda fagolizozomların oluşumunu geciktirme
Protein sekresyon sistemleri	Toksinlerin konak hücreye enjeksiyonu ve protein salınımı (Tip I, Tip II, Tip III, Tip IV, Tip V)
Tip I, Tip II (T1SS, T2SS)	Hemolitik proteinlerin salgılanmasında
Tip III (T3SS)	Bakteriyel patogeneзде
Tip IV (T4SS)	Fagositlerde hücre içi sağkalımda
Tip V (T5SS)	Bakteriyel adezyonda
Ekstraselüler lipaz, metalloproteaz ve serin proteazlar	Bakterilerin epitel hücreleriyle doğrudan etkileşiminde, matriks proteolizinde ve invazyonda
Sideroforlar	Ortamdaki demiri bağlamada
Biyofilm oluşumu	Çevresel zararlı etkenlerden, konak savunma sisteminden ve antimikrobiyal ajanlardan korunmada

2.4. *B. cepacia* Kompleksi'nin Epidemiyolojisi ve Gıdalarda Varlığı

Bcc türlerinin kolonize olduğu çevreler çok çeşitli olup; toprakta, bitkilerde ve bazı su kaynaklarında bulunabilmektedir. Bu türler hastane ortamlarında kişilere damlacık yoluyla doğrudan bulaşabildiği gibi seyreltilmiş dezenfektanlarda üreyerek cihaz ve aletleri kontamine ederek de bulaşabilmektedir. Solunum cihazları, su kaynakları, ıslak yüzeyler, lavabo ve musluklar, fizyolojik ve distile sular, ilaçlar ve dezenfektanlar diğer epidemiyolojik risk faktörlerindedir. Sağlık kurumlarında yaygın bulunması özellikle yoğun bakım birimlerinde salgınlara yol açması bu bakterinin sürekli gündemde olan bir patojen olmasına neden olmaktadır (Baylan, 2012).

Önemli akciğer patojenlerinden olan *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Haemophilus influenzae* ile beraber son zamanlarda *B. cepacia* kompleks üyeleri de büyük önem taşımaktadır. Bu bakterilerin genellikle bağışıklığı zayıf kanser hastalarında sık görüldüğü saptanmıştır (LiPuma, 2007). Solunum yollarında özellikle *P. aeruginosa* ile birlikte bulunması kistik fibrozisli kişiler için büyük risk oluşturmaktadır (Isles ve ark, 1984). Kistik fibrozisli kişilerde görülen en yaygın türün *Burkholderia cenocepacia* ve bunu *B. multivorans*'ın takip ettiği görülmektedir (Drevinek ve Mahenthiralingam, 2010; Sousa ve ark., 2011). *B. cepacia* kompleks üyeleri, *B. mallei* ve *B. pseudomallei* türleri insan veya hayvan patojeni olarak bilinmektedir. *B. gladioli*, *B. fungorum* ve *B. thailandensis* insan enfeksiyonlarıyla ilişkili nadir görülen diğer türlerdir (LiPuma ve ark., 2007). Bcc türlerinin izole edildikleri kaynaklara göre dağılımları Tablo 2.6'da gösterilmiştir.

Tablo 2.6. *Burkholderia cepacia* kompleksi türlerinin izole edildikleri kaynaklara göre dağılımları (Mahenthiralingam ve ark., 2008).

Türler veya MLTS grubu	Genomovar	Toplam İzolat	KF (%)	KLİNİK (%)	ÇEVRE (%)	ENDÜST (%)
<i>B. cepacia</i>	I	45	14 (31)	12 (27)	17 (38)	2 (4)
<i>B. multivorans</i>	II	93	77 (83)	9 (10)	6 (6)	1 (1)
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	III	148	123 (83)	21 (14)	2 (1)	2 (1)
<i>B. cenocepacia</i> IIIB	III	123	84 (68)	6 (5)	25 (20)	8 (6)
<i>B. cenocepacia</i> IIIC	III	16	0	0	16 (100)	0
<i>B. cenocepacia</i> IIID	III	14	14 (100)	0	0	0
<i>B. stabilis</i>	IV	25	9 (36)	9 (36)	3 (12)	4 (16)
<i>B. vietnamiensis</i>	V	41	16 (39)	5 (12)	17 (41)	3 (7)
<i>B. dolosa</i>	VI	7	6 (85)	0	1 (14)	0
<i>B. ambifaria</i>	VII	113	6 (5)	0	106 (94)	1 (1)
<i>B. anthina</i>	VIII	10	2 (20)	0	8 (80)	0
<i>B. pyrrocinia</i>	IX	17	1 (6)	0	16 (94)	0
<i>B. ubonensis</i>	X	2	0	1 (50)	1 (50)	0
Grup K	-	59	20 (34)	5 (8)	10 (17)	24 (41)
BCC1	-	4	4 (100)	0	0	0
BCC2	-	8	4 (50)	1 (12)	3 (37)	0
BCC3	-	13	4 (31)	2 (15)	1 (7)	6 (46)
BCC4	-	3	1 (33)	0	2 (67)	0
BCC5	-	18	1 (5)	1 (5)	16 (89)	0
BCC6	-	39	2 (5)	0	37 (95)	0
Toplam		798	388	72	287	51

MLST: Multilokus dizi tiplendirmesi; KF: Kistik fibrozis hastalarından elde edilmiş izolat sayısı; KLİNİK: Kistik fibrozis dışındaki bir klinik enfeksiyondan elde edilmiş izolat sayısı; ÇEVRE: Doğal çevreden elde edilen izolat sayısı; ENDÜST: Endüstriyel kaynaktan elde edilen izolat sayısı

2.5. *B. cepacia* Kompleksi'nin Laboratuvar Tanısı

Bcc türleri bulaşıcılığının kolay olması ve antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi sebebiyle insan sağlığı açısından tür düzeyinde doğru tanımlanması gereken potansiyel bir patojen mikroorganizmadır.

2.5.1. İzolasyonu

Burkholderia cepacia kompleks bakterileri Koyun kanlı agar, Çikolatamsı agar, MacConkey agar ve Eozin Metilen Mavisini (EMB) agar gibi birçok besiyerde kolaylıkla üreyebilmektedir. Kanlı agarda üreyen bakteri kolonisi kabarık, opak ve yumuşak kıvamdadır. Bazı Bcc türleri kahverengi, kırmızı ya da eflatun pigment oluşturabilmektedir. MacConkey agarda 4-7 gün gibi uzun inkübasyon sonrasında laktoz oksidasyonuna bağlı olarak koloniler koyu pembe ve kırmızı pigment oluşturarak yapışkan özellik göstermektedir (LiPuma ve ark., 2007; Palleroni ve Holmes, 1981; Şener, 2002). Triple Sugar Iron (TSI) agar besiyerlerinde ise açık sarı pigment oluşumu gözlemlenebilmektedir. Bu besiyerleri karışık mikrofloraya sahip olmayan örneklerde izolasyon için kullanılabilir (LiPuma ve ark., 2007).

Karışık mikrofloraya sahip klinik örneklerde izolasyon güç olduğundan bileşimce zengin selektif besiyerlerinin kullanılması önerilmektedir. Bu besiyerlerde üç günlük inkübasyon sonrasında gözle görülebilir koloni oluşumu gerçekleşmektedir (Horasanlı ve ark., 1997; LiPuma ve ark., 2007; Palleroni ve Holmes, 1981; Şener, 2002). Bcc türlerinin izolasyonlarında laktoz ile desteklenmiş oksidasyon-fermentasyon agar (OFPBL), *Pseudomonas cepacia* agar (PC) ve son zamanlarda geliştirilen *Burkholderia cepacia* selektif agar (BCSA) yaygın olarak kullanılmaktadır (Baylan, 2012).

2.5.2. Tanımlanması

Burkholderia cepacia kompleks bakterilerini rutin olarak tanımlamak için seçici besiyeri, ticari otomatize sistemler veya biyokimyasal testler kullanılmaktadır. Ancak türlerin fenotipik özellik yönünden birbirlerine benzerlik göstermelerinden dolayı bu testler, türlerin kesin tanısı ortaya koyamamaktadır. Bu nedenle bu türlerin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler yetersiz kalmaktadır. Fenotipik tanımlamanın doğrulanması ve tür düzeyinde ayırım yapılabilmesi için daha seçici, güvenilir ve hızlı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, birçok moleküler yöntemler geliştirilmiş olup her birinin eksi ve artı yönleri bulunmaktadır. 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 gibi tanı yöntemleri yeni moleküler tanımlama yöntemlerindedir (Altay, 2019).

Burkholderia türlerinin ayırımında kullanılan; güvenilir, hızlı ve uygun maliyetli tekniklerden olan matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) en güncel teknolojilerden biridir. Moleküler tanı yöntemleri klasik yöntemlere göre daha seçici, daha güvenilir, istenildiği anda tekrarlanabilen ve kısa zaman içerisinde sonuç verebilen yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerin zahmetli, yüksek maliyetli, geniş veri tabanı ve cihazlar gerektiren yöntemler olmasından dolayı tanı laboratuvarlarındaki kullanımları sınırlıdır (Altay, 2019). Bcc türlerinin tanımlanmasında kullanılan bazı moleküler yöntemler Tablo 2.7'de gösterilmiştir.

Tablo 2.7. Bcc türlerinin tanımlanmasında kullanılan bazı moleküler yöntemler

YÖNTEM	AMAÇ
Tüm hücre protein analizi	Tüm hücre protein profillerinin DNA-DNA hibridizasyon deneyleri ile yapılan sayısal analiz sonuçlarının karşılaştırılması esasına dayanır.
Tüm hücre yağ asidi analizi	Metil ester analizi esasına dayanır.
16S rRNA gen tabanlı analizler	Referans suşlarının 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılması esasına dayanır.
<i>recA</i> geni tabanlı analizler	<i>recA</i> genlerin analizine dayalıdır.
Multilokus sekans analizi (MLSA)	Nükleotid farklılıklarının ayırım derecesi esas alınarak benzer izolatlar aynı tür kabul edilir.
Tüm genom çalışmaları	Bakterilerin tüm genomik bilgilerinin ortaya çıkarılması esasına dayanır.
Diğer yöntemler	Genomik DNA'nın amplifiye edilmiş fragman uzunluğu analizi, <i>fur</i> ve <i>hisA</i> gen dizisi analizi

2.6. *B. cepacia* Kompleksi Türlerinden İleri Gelen Enfeksiyonlar

Burkholderia cepacia kompleks bakterileri, sağlıklı bireylerde nadiren enfeksiyona sebep olmaktadır. Ancak enfeksiyonun etkisi kistik fibrozis, immün sistemi zayıf ve kanserli hastalarda çok daha ağırdır. Bu bireylerde asemptomatik taşıyıcılıktan pnömoniye kadar değişen birçok klinik olgular vardır. Hastalığın ilerleyen evrelerinde ise ciddi ölümlerin olduğu bildirilmiştir (Baylan, 2012). Bcc türlerinden ileri gelen başlıca enfeksiyonlar şunlardır:

- Solunum Yolu Enfeksiyonları
- Üriner Sistemi Enfeksiyonları
- Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları
- Bakteriyemi /Septisemi
- Pnömoni

B. cepacia kompleks bakterileri özellikle kistik fibrozisli kişilerde solunum yoluna girdikten sonra konağın mukozal veya epitel yüzeylerine yapışarak enfeksiyonu başlatmaktadır. Epitel bariyeri geçtikten sonra akciğere yayılarak bakteriyemiye sebep olmaktadır (Demir ve ark., 2005; Leita0 ve ark., 2010).

2.7. *B. cepacia* Kompleksi'nin Tedavisi

Burkholderia cepacia kompleks bakterilerinden kaynaklanan enfeksiyonların tedavisi, bakterinin birçok antibiyotiğe karşı geliştirdiği dirençten ötürü çok zordur. Bu sebeple bakterinin duyarlı olduğu antibiyotiğin belirlenmesi çok önemlidir. Bu türler Aminoglikozidler, Sefalosporinler, Penisilinler ve Polimiksin'ler gibi antibiyotik gruplarına karşı oldukça dirençlidir (McGowan, 2006). Ayrıca Povidon iyodür, Klorheksidin ve Benzalkonyum klorür gibi dezenfektan ve antiseptiklerde direnç saptanabilmektedir (Baylan, 2012).

Trimetoprim sülfametoksazol, seftazidim, meropenem, siprofloksasin antibiyotikleri bu bakterilere karşı en etkili ajanlar olarak bildirilmiştir. Ancak buna rağmen kistik fibroz hastalarından izole edilen *B. cepacia* komplekslerinin bu antibiyotiklere karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bcc bakterilerinden bazıları bu antibiyotiklere karşı daha duyarlı bulunmakla birlikte genomvar III'e bağılı bulunan bazı türler, kullanımda olan antibiyotiklerin tamamına karşı direnç geliştirmişlerdir (Quinn, 1998).

Bcc türlerinin tedavisi amacıyla yeni geliştirilen sadece birkaç tane antimikrobiyal bulunmaktadır. Bu türlerine bağılı olarak gelişen enfeksiyonlarda kullanılan antibiyotiklerin yanıtları, etkenin dirençli olup olmamasına göre değişmektedir (Zahariadis ve ark., 2003). Bu etkenlerin oluşturduğu enfeksiyon tedavilerinde ise CLSI tarafından standardize edilen yöntemlerle duyarlılığı araştırılıp uygun antibiyotiklerin kullanılması önerilmektedir (Leita0 ve ark., 2010; LiPuma ve ark., 2007; Öztürk, 2008; Quinn, 1998; Şener, 2002).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmada Kullanılan Malzemeler

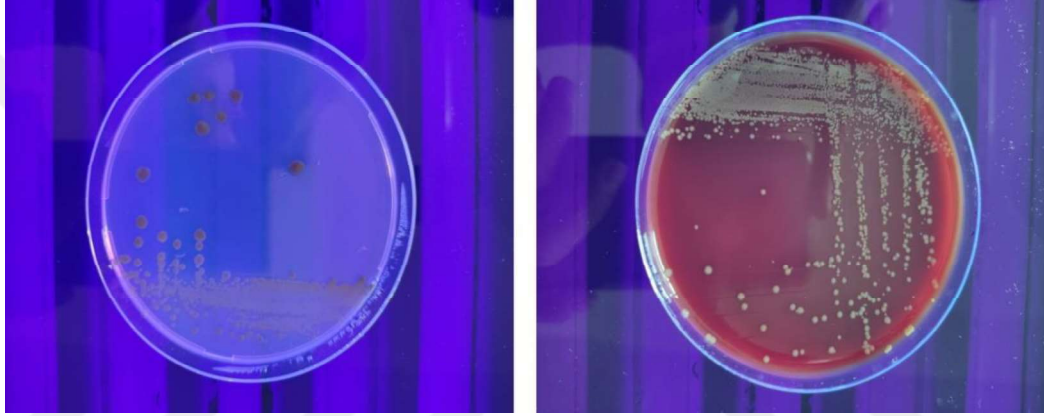
Tez çalışmasında kullanılan malzemelerin listesi Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Analizlerde kullanılan malzeme listesi

Malzemeler	Ürün Markası
<i>Burkholderia cepacia</i> Selective Agar	HIMEDIA MU2089
BCSA Selective Supplement	HIMEDIA FD361
Nutrient Broth	MERCK 105450
Mueller Hinton	MERCK 103872
Plate Count Agar (PCA)	MERCK 105463
Trypticasein Soy Agar (TSA)	CONDALAB 1068.00
Phenol Red Broth	MERCK 110987
Gram Boyama Seti	MERCK 111885
BBL Oxidase Reagent Droppers	BD 261181
Glucose	PANREACAPPLICHEM,143140.1211
Sucrose	PANREAC APPLICHEM,141621.1211
Laktose	PANREAC APPLICHEM,141375.1210
Nitrate Broth	MERCK 72548
Sülfanilik Asit	MERCK 100686
Alfa Naftol	MERCK 822289
Çinko Tozu	MERCK 108789
GeneJET Genomic DNA Purificationa Kit	Thermo Fisher Scientific, K0722
5 x FIREPol Master Mix	Solis Biodyne
Agarose	Biomax, HS8000
Gene Ruler DNA Ladder	Termo Fisher Scientific, SM0321
Tris EDTA	GENEON
Etidyum Bromür Solüsyon	SNP, 18S-00 (10 mg/ml)
NaCl	ChemBio
Methanol	MERCK 106094
Kristal Viyole	PANREAC APPLICHEM,141375.1210
Asetik Asit	MERCK, 100063
Ceftazidime (30 µg)	BIOANALYSE
Meropenem (10 µg)	BIOANALYSE
Minocycline (30 µg)	BIOANALYSE
Trimethoprim-sulfamethoxazele(1.25/23.75µg)	BIOANALYSE
0,22 µm’lik Membran Filtre Kağıdı	MERCK MILLIPORE

3.1.2. Araştırmada Kullanılan Suşlar

Çalışmamızda, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi'nden temin edilen *Burkholderia cepacia* suşu, tüm testlerde pozitif kontrol amaçlı kullanılmıştır. Pozitif suşta herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı mikrobiyolojik yöntemlerle incelenmiş, biyokimyasal testlerle doğrulaması sağlanmıştır. Doğrulaması sağlanan suşların Nutrient broth besiyerinde 37°C' de 24 saatlik taze kóltureleri %40'lik gliserol içerisinde -20°C'de saklanmıştır. *Burkholderia cepacia* suşunun BCSA ve koyun kanlı agar besiyerindeki koloni görüntüsü şekil 3.1'de gösterilmiştir.



şekil 3.1. a) BCSA besiyerinde *Burkholderia cepacia* 'nın koloni görüntüsü b) Koyun kanlı agar besiyerinde *Burkholderia cepacia* 'nın koloni görüntüsü

3.2. Metot

3.2.1. Örneklerin Toplanması

Burdur ili ve çevresinden haftalık periyotlarla temin edilen numuneler (60 adet çiğ inek süt, 30 adet çiğ keçi sütü, 30 adet çiğ koyun sütü, 10 adet peynir, 10 adet tereyağ, 10 adet yoğurt) steril cam şişelerde ve soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırıldı. Örnekler MAK Veteriner Fakóltesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi laboratuvarında analize alındı. Yine Burdur ili ve çevresindeki değişik noktalardan alınan tüm su eřitleri (klorsuz, 60 adet kaynak suyu; klorlu, 60 adet ieme kullanma suyu) steril tiyoslfatlı şişelerde ve soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırılıp analizi gerçekleştirildi.

3.2.2. Örneklerden Bakterilerin Kültürel İzolasyonu

3.2.2.1. Süt ve Süt Ürünleri

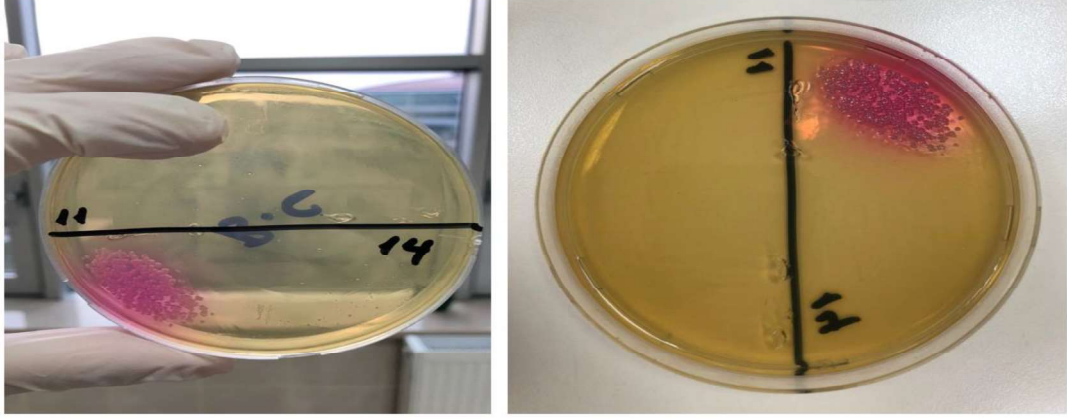
Laboratuvara ulaştırılan örneklerde ilk olarak ön zenginleştirme amacıyla 25 ml süt örneği 225 ml Nutrient broth üzerine eklenip vortekslendi, süt ürünlerinden (peynir, yoğurt, tereyağ) ise 25 gr tartılarak 225 ml'lik Nutrient broth üzerine aktarılıp stomacherda 2 dakika süreyle homojen hale getirildi. Ön zenginleştirme prosesi 30°C' de 24 saat süreyle yapıldı. Nutrient broth besiyerinde zenginleştirilmiş örneklerin görüntüsü Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



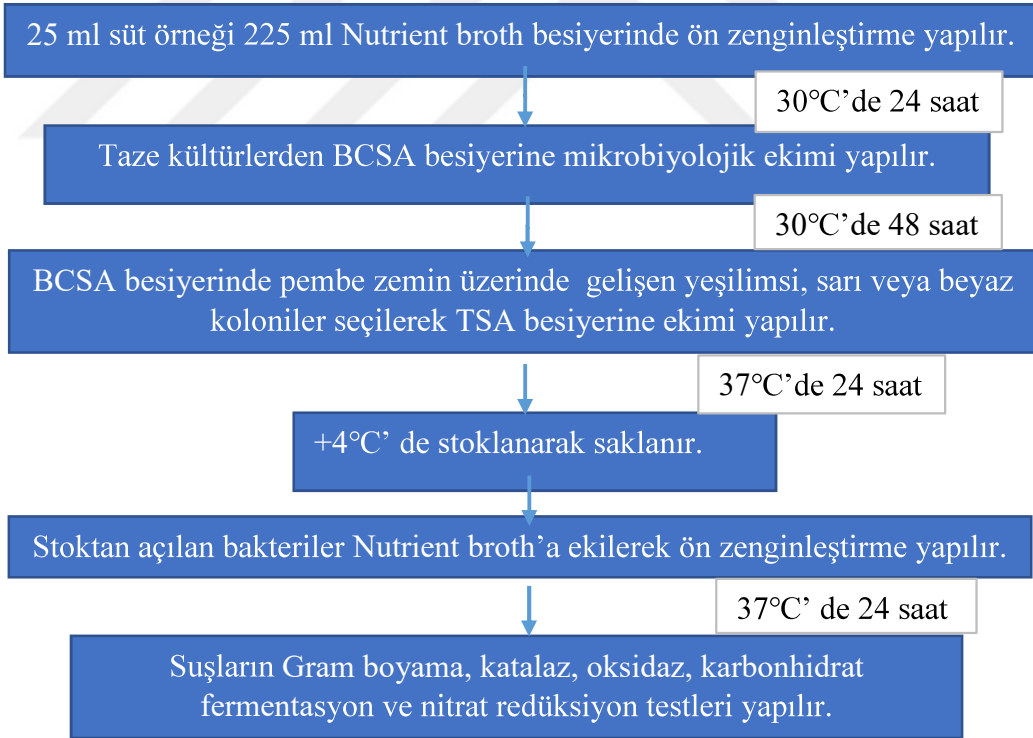
Şekil 3.2. a) Süt ürünlerinde ön zenginleştirme işlemi b) Süt örneklerinde ön zenginleştirme işlemi

Gıda örneklerinde *Burkholderia cepacia*'nın izolasyonu için *Burkholderia cepacia* selective agar (BCSA) kullanıldı. Ön zenginleştirme işlemi sonrasında taze kültürlerden selektif besiyerine yayma yöntemiyle ekim yapılarak petriler 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı (John ve ark., 2001). Kolonilerdeki renk değişimlerini gözlemlemek amacıyla inkübasyon süresi 5 gün daha uzatıldı. BCSA besiyerinde üreyen kolonilerin görüntüsü Şekil 3.3'te gösterilmiştir. Daha sonra selektif besiyerinde gelişen şüpheli koloniler, pozitif kontrol suşla karşılaştırıldı. *B. cepacia* açısından şüpheli olduğu düşünülen suşların sonrası analizlerde kullanılmak üzere

bakteri kültürleri hazırlandı. Kültürler, yatık TSA besiyerine ekilip 37°C’de 24 saat süreyle üretildi ve +4°C’de stoklama için saklandı. Örneklerin kültürel ekim aşaması Şekil 3.4’te gösterilmiştir.



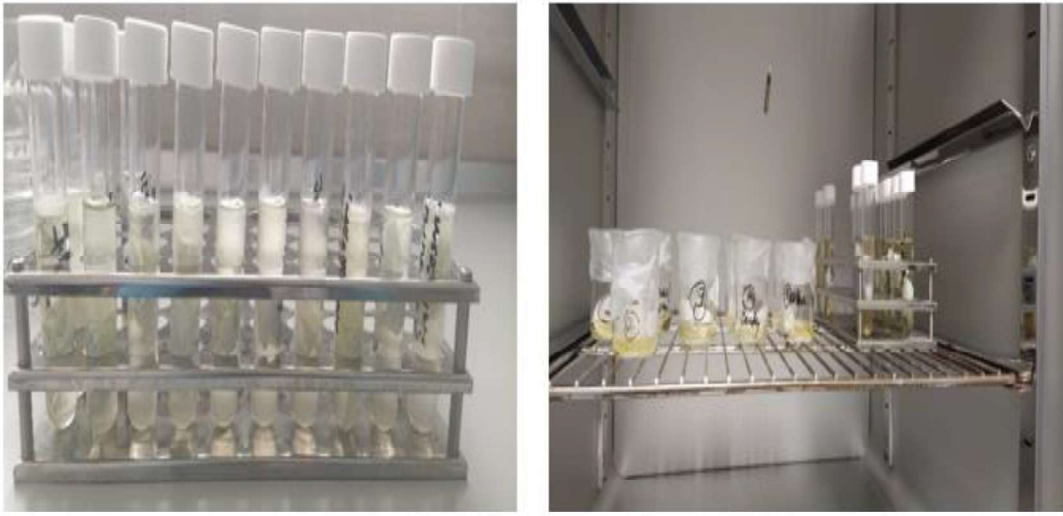
Şekil 3.3. BCSA besiyerinde üreyen koloniler



Şekil 3.4. Süt örneklerinde kültürel ekim şeması

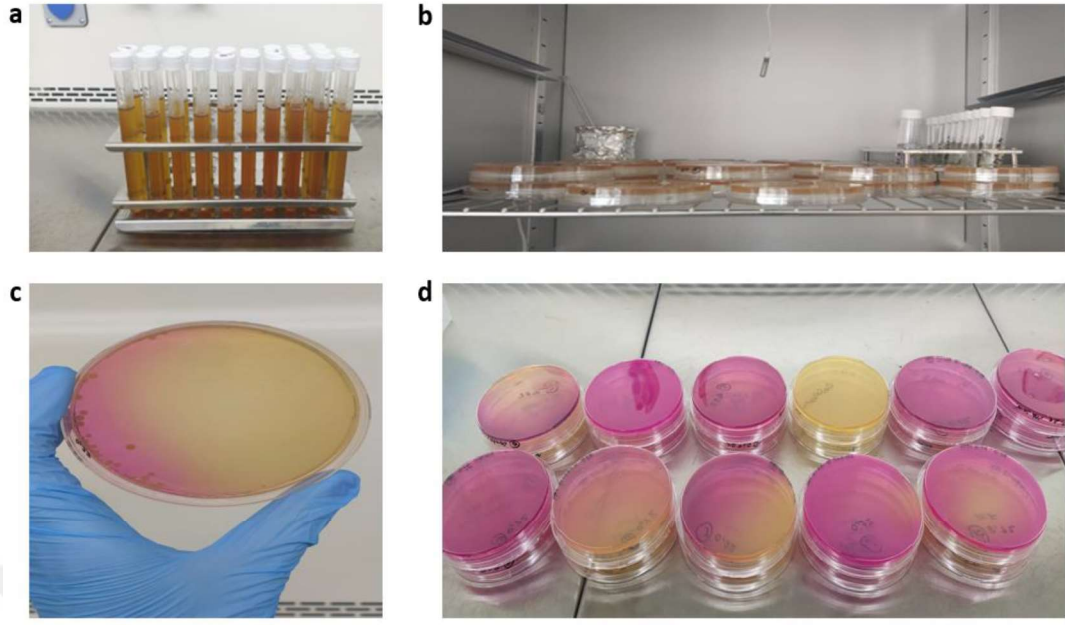
3.2.2.2. Su Örnekleri

Su numuneleri, membran filtrasyon yöntemine göre yaklaşık 400 ml olacak şekilde nitroselüloz filtrelerden (0.22 µm) geçirilip filtre düzeneğinden süzüldü. Elde edilen filtre kağıdı, steril 9 ml Nutrient broth içeren tüplere aktarılarak ön zenginleştirme işlemi için 30°C’de 24 saat süreyle inkübe edildi (John ve ark., 2001). Membran filtre kağıtları kullanılarak yapılan sudaki ön zenginleştirme işlemine ait görüntüler Şekil 3.5’te gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Membran filtre kağıtları kullanılarak yapılan sudaki ön zenginleştirme işlemi

İnkübasyon sonrası *Burkholderia cepacia* bakterisinin izolasyonu için taze kültürlerden 1 ml steril petrilere aktarılarak dökme plak yöntemine göre BCSA besiyerine ekim yapıldı. Petriler 30°C’de 48 saat inkübe edilip tipik *Burkholderia cepacia* kolonileri yönünden incelendi. Yine koloni morfolojisindeki değişimini anlamak amacıyla inkübasyon süresi 5 güne çıkarıldı. BCSA besiyerinde pembe zemin üzerinde üreyen şüpheli *B. cepacia*’nın koloni görüntüsü Şekil 3.6’da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. a) Otoklavlanmış tüplerdeki BCSA besiyeri b) Dökme plak yöntemine göre çalışılan petri görüntüleri c) BCSA besiyerinde üreyen şüpheli *B. cepacia* kolonileri d) Pembe zemin üzerinde görüntülenen koloniler

Selektif besiyerinde tespit edilen şüpheli koloniler PCA'da çoğaltılıp sonraki çalışmalarda kullanılmak amacıyla stoklanmak üzere TSA'ya aktarıldı ve +4°C'de saklandı.

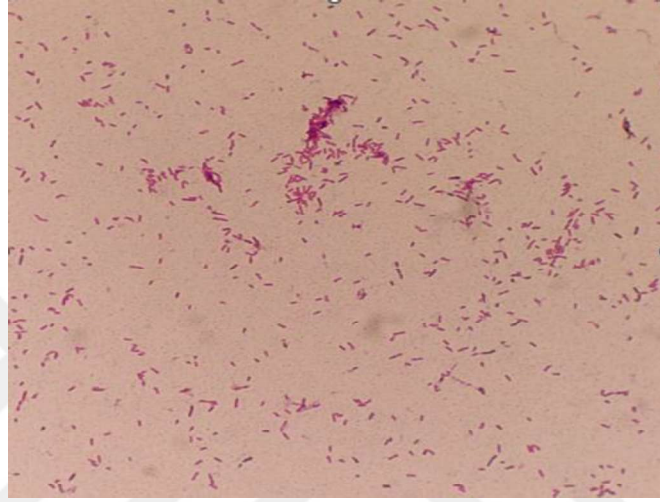
3.2.3. Bakterilerin Rutin Yöntemlerle Tanımlanması

Stoktan (-20°C, +4°C) açılan izolatlar Nutrient broth besiyerinde zenginleştirildi. Bu izolatlara ilk olarak Gram boyama, oksidaz ve katalaz testleri yapıldı. Katalaz ve oksidaz testleri pozitif olan, basil formu, tüm Gram negatif izolatlar *Burkholderia cepacia* şüpheli olarak değerlendirildi. Daha sonra, karbonhidrat fermentasyon ve nitrat redüksiyon testleri yapılarak *Burkholderia cepacia* şüpheli olarak tespit edilen izolatların tür düzeyinde tanımlanması için önce DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi, ardından PZR ile doğrulaması sağlandı.

3.2.3.1. Gram Boyama

Gram boyama preparatları, izolatların Nutrient broth besiyerinde zenginleştirilen taze kültürlerinden hazırlandı. Bir öze dolusu örnek lam üzerine

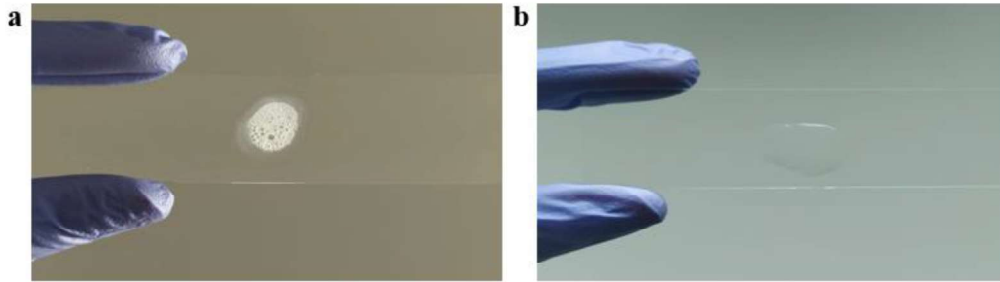
dikkatlice yayıldı. Bek alevinden geçirilen preparatlar fikse edilip sırasıyla Kristal viyole (1 dk), Lugol (1dk), %95'lik Etil alkol (15 sn) ve Safraninle (1 dk) boyanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Mikroskopik incelemeler sonucunda pembe renkli basil şeklinde görünen Gram negatif bakteriler, *Burkholderia cepacia* açısından şüpheli olarak değerlendirilerek diğer biyokimyasal işlemlere tabi tutuldu. Süt örneği içerisindeki Gram negatif basillerin mikroskopik görüntüsü Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Süt örneği içerisindeki Gram negatif basiller

3.2.3.2. Katalaz Testi

TSA besiyerinde üreyen tek kolonilerden steril öze yardımıyla alınan örnek temiz bir lam üzerine yayıldı, üzerine birkaç damla %3'lük H₂O₂ solüsyonu damlatıldı. Gaz oluşumu görülen izolatlar, katalaz pozitif (+) olarak değerlendirildi. Katalaz testinde pozitif ve negatif sonuçlara ait görüntüler Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



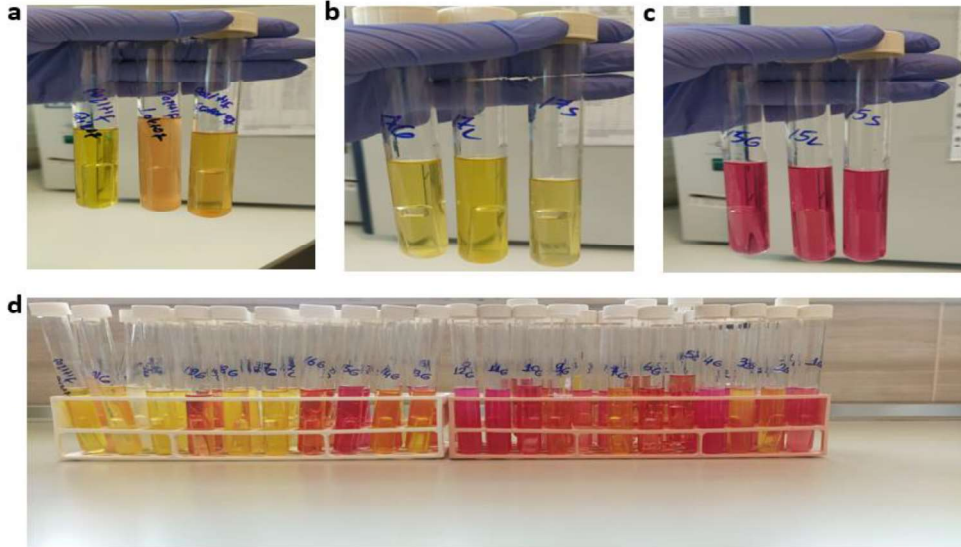
Şekil 3.8. a) Katalaz (+) b) Katalaz (-)

3.2.3.3. Oksidaz Testi

TSA besiyerinde üreyen kolonilerden bir öze dolusu örnek steril filtre kağıdına yayıldı ve üzerine oksidaz solüsyonundan biraz damlatıldı. Kağıt üzerinde mor renk oluşturan izolatlar, oksidaz pozitif (+) olarak değerlendirildi.

3.2.3.4. Karbonhidrat Fermentasyon Testi

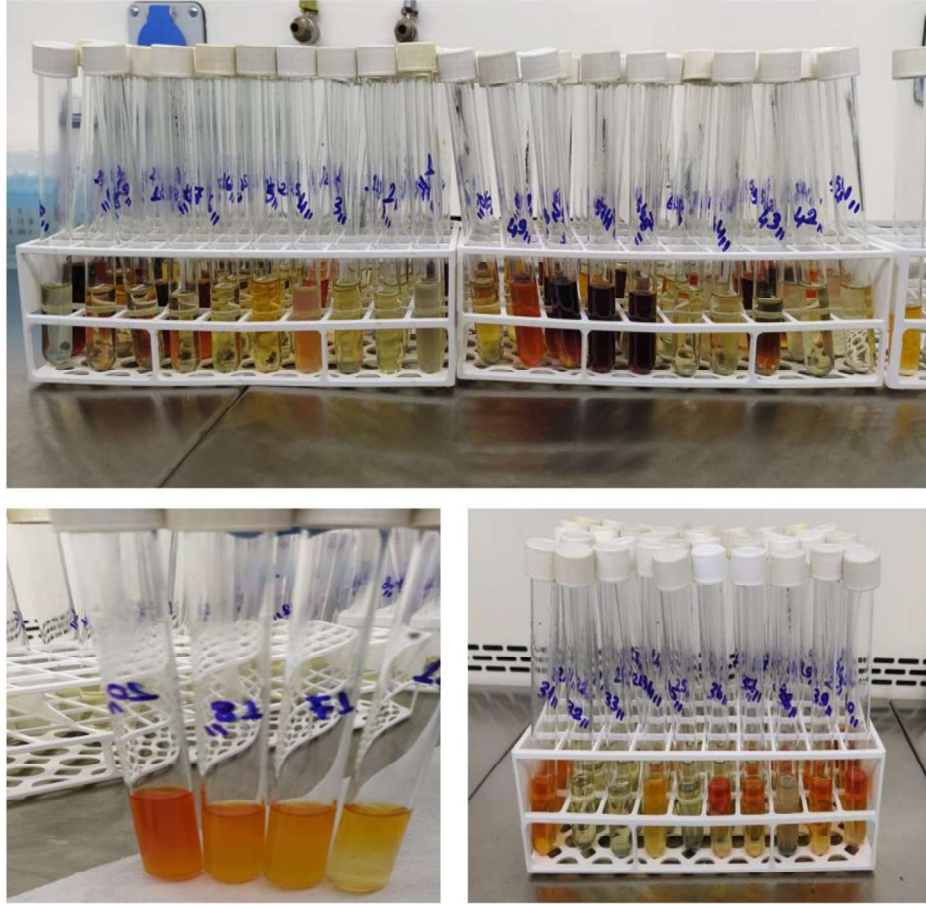
Karbonhidrat fermentasyon testi için glukoz, laktoz ve sükroz karbonhidratlarından 5 gr tartıldı ve 100 ml steril su içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan şeker çözeltileri 0,45 µm filtreden geçirildi. Phenol Red broth besiyeri 8 ml olacak şekilde tüplere dağıtıldı ve içerisine Durham tüpü eklenerek otoklavlandı. Phenol Red broth içeren tüplere 2 ml şeker çözeltisi eklendi. Daha sonra, Nutrient broth besiyeri içerisinde hazırlanan izolatlardan 0.1 ml aktararak 37°C’de 14 gün inkübasyona bırakıldı. Tüplerdeki renk değişimi ve gaz-asit oluşumu her gün gözlemlenerek pozitif kontrol suşla karşılaştırıldı. Tüp içerisinde gaz çıkışının olması ve besiyeri renginin sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirildi (Anonim, 2022). Örneklerin karbonhidrat fermentasyon testi sonuçları Şekil 3.9’da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. a) Pozitif suş *B. cepacia*'nın karbondhidrat fermentasyon testi sonuçları b) Sarı renge dönüşen besiyerinde gaz kabarcıkları oluşumu, (+) reaksiyon c) Rengi değişmeyen besiyeri, (-) reaksiyon d) Örneklerin karbondhidrat fermentasyon testi sonuçları

3.2.3.5. Nitrat Redüksiyon Testi

Nitrat broth içeren tüplere taze kültürlerden 0.1 ml aktarıldı ve tüpler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplere Sülfanilik asit ve Alfa-naftol çözeltilerinden 0.25 ml damlatılarak nitrit oluşumu gözlemlendi. Tüplerde kırmızı renk oluşumu nitrattan nitrit üretiminin olduğu şeklinde yorumlandı. Kırmızı rengin oluşmadığı tüpler ise çinko tozu ilavesiyle 5-10 dk bekletildi. Bekleme sonucunda tüplerde kırmızı renk oluşumu nitratların hala mevcut olduğu şeklinde değerlendirildi (Stern ve ark., 2001). Örneklerin nitrat redüksiyon testi sonuçları Şekil 3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10. Örneklerin Nitrat redüksiyon testi sonuçları

3.2.4. Bakterilerin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

3.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu

Şüpheli izolatların DNA ekstraksiyonu, GeneJET Genomik DNA Purification Kit'i (Thermo scientific) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. İzolatlar, bir gece öncesinde 5 ml Nutrient broth içerisine 30 µL ekim yapılarak canlandırıldı. Canlandırılan izolatlar 1500 ml steril eppendorf tüplere aktarılıp 5000xg'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerin üst kısmındaki şeffaf süpernatant atıldı. Dipte kalan pellet üzerine 180 µL 'Digestion' solüsyonu eklendi. 20 µL'lik Proteinaz K solüsyonu da eklenip vortekslenerek karışım homojen hale getirildi. Hazırlanan tüpler enzimin aktifleşmesi için 56°C'de 30 dk sirkülasyonlu su banyosunda bekletildi. Ardından tüplere 20 µL Rnase A solüsyonu eklenerek vortekslendi ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sürenin bitmesiyle karışıma 200 µL lizis solüsyonu eklenip 15 sn vortekslendi. Karışımın üstüne 400 µL %50'lik Etanol eklenip tekrar 15 sn vortekslendi. Mevcut karışımın tamamı spin koleksiyon tüplerine aktarılıp 6000xg'de 1 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası koleksiyon tüpü atılıp yeni koleksiyon tüpü yerleştirildi. Üzerine 500 µL 'Wash buffer 1' solüsyonu eklenerek 8000xg'de 1 dk santrifüjlendi. Koleksiyon tüpleri yenilenerek 'Wash buffer 2' solüsyonundan 500 µL eklenip 12.000xg'de 3 dk santrifüjlendi. Koleksiyon tüpü atılıp steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 200 µL 'Elution buffer' tüp içerisine aktarılıp 2 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonra 8000xg'de 1 dk santrifüjlendi. İzole edilen DNA'lar Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) analizi için kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.2.4.2. PZR Karışımlarının Hazırlanması ve Amplifikasyonların Elde Edilmesi

Kültürel yöntemlerle izole edilip biyokimyasal testlerle tanımlanan şüpheli izolatların doğrulaması için PZR analizi gerçekleştirildi. Tablo 3.2'de gösterilen *recA* ve 16S rRNA gen bölgesine ait spesifik primerler üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı.

Tablo 3.2. PZR analizinde kullanılan primerler, primer uzunlukları ve hedef gen bölgeleri (McDowell ve ark., 2001).

Primer Adı	Primer Dizisi (5' → 3')	Primer Boyu (bp)	Hedef Gen Bölgesi
BCR1	TGA CCG CCG AGA AGA GCA A	1040 bp	<i>recA</i> geni- <i>B. cepacia</i> complex
BCR2	CTC TTC TTC GTC CAT CGC CTC		
PSL1	AAC TAG TTG TTG GGG ATT CAT TTC	209 bp	16S rRNA geni- <i>B. cepacia</i>
PSR1	TTT CGA GCA CTC CCG CCT CTC AG		

Şüpheli izolatlar için PZR reaksiyon karışımı, Solis Bio Dyne markasına ait FIREPol Master Mix ile Tablo 3.3'e göre toplam hacim 20 µL olarak hazırlandı. Bir örnek için 1.5 ml'lik eppendorf tüp içerisine master mix'den 4 µL, her bir forwad ve reverse primer'dan 0.5 µL, ultra saf sudan 12 µL aktarılarak pipetaj yapıldı. 0.2 ml'lik mikro tüp içerisine şüpheli izolatın DNA'sından 3 µL, master karışımdan 17 µL eklenerek hazırlanan örnekler Thermal Cycler cihazına yerleştirildi. Pozitif kontrol için hazırlanan PZR reaksiyon karışımı Tablo 3.4'te, Negatif kontrol için hazırlanan PZR reaksiyon karışımı Tablo 3.5'te gösterilmiştir. Şüpheli izolatlarda *recA* ve 16S rRNA genlerini tespit etmek için gerekli sıcaklık ve döngü koşulları ise Tablo 3.6'da ve Tablo 3.7'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Şüpheli izolatlar için hazırlanan PZR reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim
FIREPOL Master Mix	4 µL
F primer	0.5 µL
R primer	0.5 µL
Ultra saf su	12 µL
DNA	3 µL

Tablo 3.4. Pozitif kontrol için hazırlanan PZR reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim
FIREPOL Master Mix	4 µL
F primer	0.5 µL
R primer	0.5 µL
Ultra saf su	12 µL
DNA	3 µL

Tablo 3.5. Negatif kontrol için hazırlanan PZR reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim
FIREPOL Master Mix	4 µL
F primer	0.5 µL
R primer	0.5 µL
Ultra saf su	12 µL

Tablo 3.6. *Burkholderia cepacia* kompleks bakterilerinde *recA* genini tespit etmek için gerekli PZR koşulları (McDowell ve ark., 2001).

PZR Basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	96°C	3 dk	-
Denatürasyon	96°C	1 dk	} 35
Bağlanma	56°C	1 dk	
Uzama	72°C	1.5 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	-

Tablo 3.7. *Burkholderia cepacia* bakterilerinde 16S rRNA genini tespit etmek için gerekli PZR koşulları (Campbell ve ark., 1995).

PZR Basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94°C	6 dk	-
Denatürasyon	94°C	1 dk	} 30
Bağlanma	57°C	1 dk	
Uzama	72°C	2 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	-

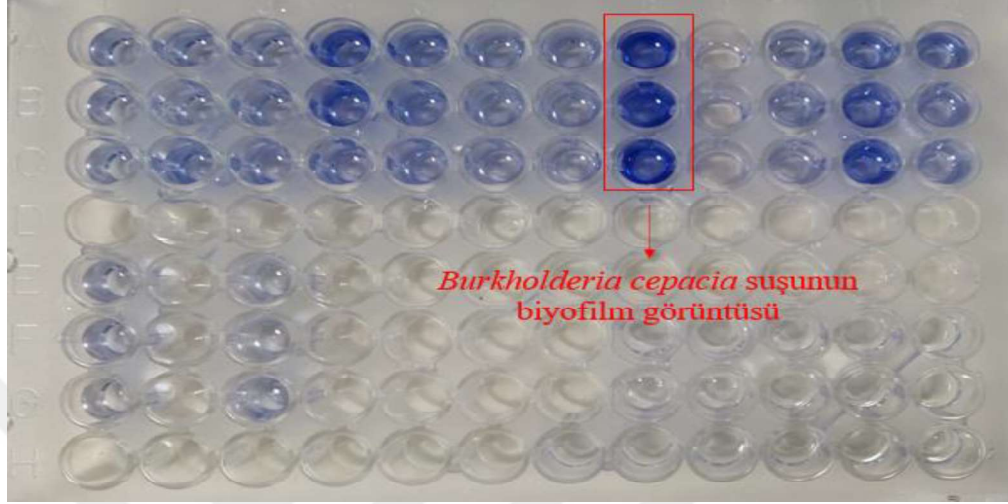
3.2.4.3. PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

PZR işleminde çoğaltılan DNA bölgelerinin baz uzunluklarının belirlenmesi amacıyla agaroz jel elektroforezi uygulandı. 2.1 gr agaroz'a 200 ml 1X TBE tamponu ilave edilerek 95°C'deki su banyosunda iyice çözdürüldü. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulan jelin içerisine Etidyum Bromür boyasından 5 µL eklendi. İçerisine tarak yerleştirilmiş elektroforez jel kuvvetine döküldü ve yaklaşık 45 dk katılaşması için bekletildi. Bekleme süresinin bitmesiyle taraklar jelden dikkatlice çıkartılarak elektroforez tankının içerisine yerleştirildi. Jelin üzerini geçecek şekilde yürütme tamponu olarak 1X TBE çözeltisi eklendi. Daha sonra jel içerisindeki kuyucuklardan ilkinde bant uzunluklarını saptamak için 5 µL DNA Ladder eklendi. Akabinde diğer kuyucuklara sırasıyla 5 µL olacak şekilde pozitif kontrol, negatif kontrol ve örneklerin PZR ürünlerinden yüklendi. 180 voltta 60 dk süre ile yürütme işlemi yapıldı. Daha sonra jelde oluşan bantların konumları UV ışığı altında görüntüledi. Oluşan bantlar, pozitif kontrol ve DNA marker ile karşılaştırılarak yorumlandı.

3.2.5. *Burkholderia cepacia*'nın Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi

Burkholderia cepacia suşunun biyofilm oluşumu 96 kuyucuklu mikroparka kullanılarak tespit edildi. Pozitif suş, bir gece önceden 5 ml Nutrient broth içerisinde 37°C'de inkübe edildi. BCSA besiyerine geçişi yapılarak tekrar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Katı besiyerinde üreyen tek kolonilerden steril öze ile alınarak 0,85 NaCl içeren tüpte McFarland değeri 0,5 bulanıklık olacak şekilde ekimi yapıldı. Taze olarak hazırlanan Nutrient broth besiyerinden 180 µL olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı. Bulanıklığı ayarlanan pozitif suştan 20 µL miktarda kuyucuğa eklendi. Çalışmada bir suş için 3 kuyucuk kullanılarak tekrar edildi. Plaka 25°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka ters çevrilerek besiyeri hafifçe vurularak çıkarıldı. Kuyucuklar 3 kez %0,85 NaCl ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra, kuyucuklara 200 µL metanol ilave edilerek fiksasyon sağlandı. Metanolün giderilmesiyle plaka oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Boyama için her kuyucuğa 200 µL Kristal viyole ilave edildi ve plaka 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Boya boşaltılıp plaka hafifçe çeşme suyunda yıkandı. Ardından kuyucuklar tekrar kurutuldu ve üzerine 200 µL %33'lük Asetik asit ilave edildi. Homojen haldeki plaka

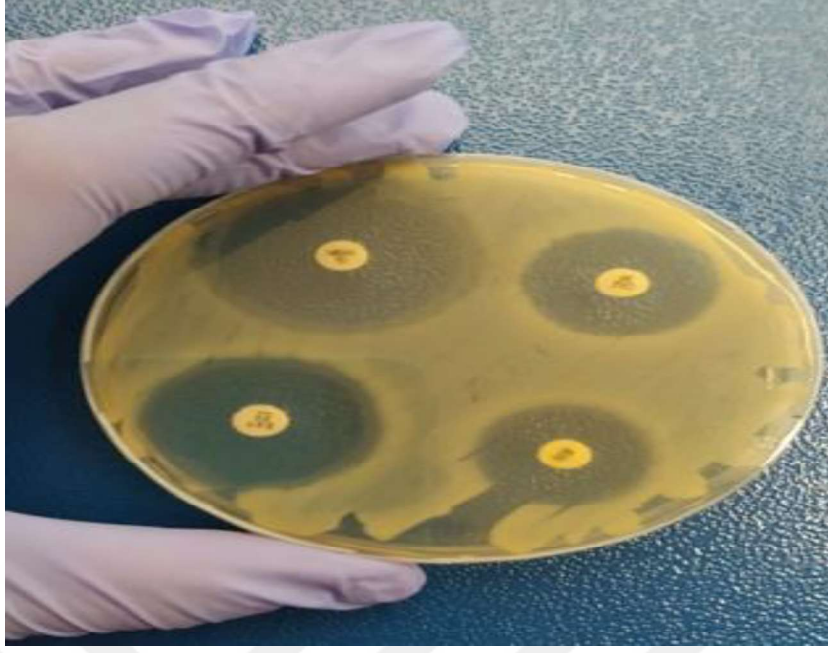
spektrometre cihazına yerleştirilerek 590 nm’de okuma yapıldı. Absorbans değerinin 0,5’den büyük olması pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Yavuz, 2017). *Burkholderia cepacia* suşunun biyofilm görüntüsü Şekil 3.11’de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Çalışmada kullanılan *Burkholderia cepacia*’nın biyofilm görüntüsü

3.2.6. *Burkholderia cepacia*’nın Antibiyotik Duyarlılıklarının İncelenmesi

Duyarlılık testleri, *Burkholderia cepacia* suşu ile CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından belirlenmiş disk difüzyon (DD) yöntemine göre yapıldı. Pozitif suş, ön zenginleştirme amacıyla bir gece önceden 5 ml Nutrient broth besiyerinde 37°C’de inkübe edildi. BCSA besiyerine geçişi yapılarak tekrardan 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Katı besiyerinden steril öze ile alınan koloniler %0,9 NaCl içerisinde 0,5 McFarland değerinde süspansede edildi. Süspansede edilen suş, steril eküvyon çubukla Mueller Hinton Agar (MHA) üzerine homojen bir şekilde yayıldı. Daha sonra CLSI’nın önerdiği hacimlerde Ceftazidime (30 µg), Meropenem (10 µg), Minocycline (30 µg) ve Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg) antibiyotik diskleri petrilere steril pens ile yerleştirildi. Petriler 37°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası disk çevresindeki zon çapları ölçülerek sonuçları referans değerlerle karşılaştırılıp antibiyotik dirençliliği saptandı (CLSI, 2018). *Burkholderia cepacia* suşunun MHA üzerinde disk difüzyon test görüntüsü Şekil 3.12’de gösterilmiştir.



Şekil 3.12. Çalışmada kullanılan *Burkholderia cepacia*'nın MHA üzerinde disk difüzyon test görüntüsü

4. BULGULAR

Çalışmamız kapsamında, Kasım 2021-Nisan 2022 tarihleri arasında Burdur il merkezi ve çevre ilçelerindeki mandıralar, süt toplama tankerleri, halk pazarları, doğal su kaynakları ve içme kullanma sularından toplanan 270 adet gıda örneği *Burkholderia cepacia*'nın varlığı yönünden analize alındı. Toplanan örneklerin gıda türüne göre sayısal dağılımı Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Toplanan örneklerin gıda türüne göre sayısal dağılımı

Gıda türü	Örnek sayısı
İnek sütü	60
Koyun sütü	30
Keçi sütü	30
Peynir	10
Yoğurt	10
Tereyağ	10
Kaynak suyu	60
İçme kullanma suyu	60
Toplam	270

4.1. Kültürel İzolasyon Bulguları

Örneklerin kültürel ekimleri sonucunda, BCSA besiyerinde pembe zemin üzerinde üreyen sarı-yeşil renkli, yer yer de beyaz renkli koloni oluşumları görüldü. Örneklerin %52,59 (142/270)'u *B. cepacia* varlığı açısından şüpheli olarak tespit edildi. Şüpheli izolatların %52,82 (75/142)'si süt örneklerinden, %4,93 (7/142)'ü süt ürünlerinden ve %42,25 (60/142)'i su örneklerinden oluşmaktadır. Kültür izolasyonuna göre elde edilen izahatlarına dağılımı ve oranları Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Kültür izolasyonuna göre elde edilen izolatların sayısal dağılımı ve oranları

Gıda türü	İzolat sayısı	Toplam izolat sayısının %
	Süt çeşitleri	
İnek sütü	34	23,94
Koyun sütü	26	18,31
Keçi sütü	15	10,56
	Süt ürünleri çeşitleri	
Peynir	3	2,11
Yoğurt	0	0
Tereyağ	4	2,82
	Su çeşitleri	
Kaynak suyu	59	41,55
İçme kullanma suyu	1	0,70
Toplam	142	

Tablo 4.2’de belirtildiği gibi kültürel ekim sonucunda elde edilen 142 şüpheli izolat ilk olarak Gram boyama yönünden incelendi ve hücre morfolojilerine göre ayrımları yapıldı. Mikroskopta pembe renkli, Gram (-) basil görünen 92 izolat *B. cepacia* varlığı açısından şüpheli olarak değerlendirildi. Hücre morfolojilerine göre elde edilen izolatların sayısal dağılımı ve oranları Tablo 4.3’te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Hücre morfolojilerine göre elde edilen izolatların sayısal dağılımı ve oranları

Gıda türü	İzolat sayısı	Toplam izolat sayısının %
	Süt çeşitleri	
İnek sütü	12	13,04
Koyun sütü	10	10,87
Keçi sütü	6	6,52
	Süt ürünleri çeşitleri	
Peynir	0	0
Yoğurt	0	0
Tereyağ	4	4,35
	Su çeşitleri	
Kaynak suyu	59	64,13
İçme kullanma suyu	1	1,09
Toplam	92	

Tablo 4.3'e göre süt çeşitlerinden elde edilen şüpheli izolatların %13,04 (12/92)'ü çiğ inek sütü, %10,87 (10/92)'si çiğ koyun sütü, %6,52 (6/92)'si çiğ keçi sütünden oluşmaktadır. Süt ürünleri olan peynir ve yoğurt örneklerinden şüpheli izolat elde edilmemiş olup tereyağından %4,35 (4/92) oranında izolat elde edilmiştir. Su çeşitlerinden elde edilen şüpheli izolatların %64,13 (59/92)'ü kaynak suyu, %1,09 (1/92)'u içme kullanma suyundan oluşmaktadır.

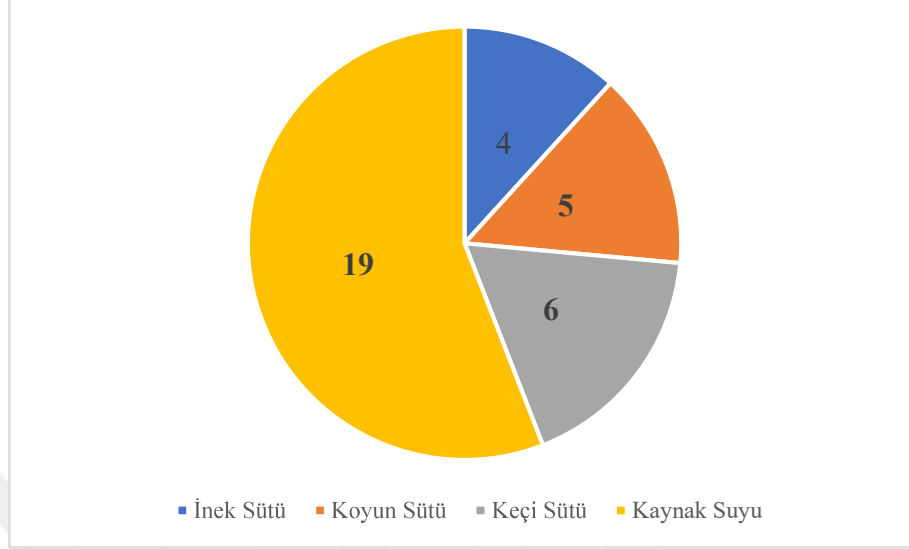
4.2. İdentifikasyon Bulguları

Tablo 4.3'de belirtilen 92 şüpheli izolatın biyokimyasal testleri yapılarak ön tanımlaması yapıldı. Ön tanımlama sonucunda 34 izolat, *Burkholderia cepacia*'ya ait biyokimyasal test profiline uygun bulundu ve şüpheli olarak değerlendirildi. Şüpheli izolatlar yüzdesel olarak ifade edildiğinde %11,76 (4/34)'sı çiğ inek sütü, %14,71 (5/34)'i çiğ koyun sütü, %17,65 (6/34)' çiğ keçi sütü, %55,88 (19/34)'i kaynak sularından oluşmaktadır. Diğer 58 izolatın ise yapılan biyokimyasal testler sonucunda *B. cepacia* ile benzer sonuçlar vermediği görüldü. Biyokimyasal test sonuçlarına göre elde edilen izolatların sayısal dağılımı ve oranları Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Biyokimyasal test sonuçlarına göre elde edilen izolatların sayısal dağılımı ve oranları

Gıda türü	İzolat sayısı	Toplam izolat sayısının %
	Süt çeşitleri	
İnek sütü	4	11,76
Koyun sütü	5	14,71
Keçi sütü	6	17,65
	Su çeşitleri	
Kaynak suyu	19	55,88
Toplam	34	

İdentifikasyon sonucu elde edilen izolatların, çalışılan gıda türüne göre sayısal dağılımı Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. İdentifikasyon sonucu elde edilen şüpheli izolatların dağılımı

Şüpheli izolatların çalışılan gıda türüne göre dağılımı ve biyokimyasal test sonuçları Tablo 4.5’te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Şüpheli izolatların gıda türüne göre dağılımı ve biyokimyasal test sonuçları

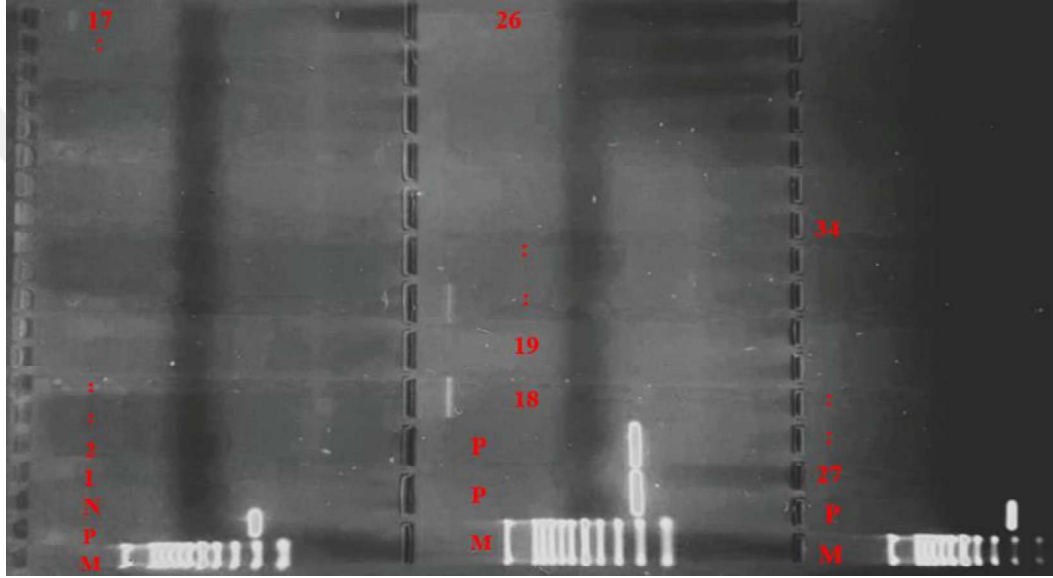
Gıda Örneği	İzolot No	Katalaz	Oksidaz	Gram Boyama	KF	NR
Kaynak Suyu	A1	+	+	Gram (-), Basil	+	-
Kaynak Suyu	A2	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A3	+	+	Gram (-), Basil	+	-
Kaynak Suyu	A4	+	+	Gram (-), Basil	+	-
Kaynak Suyu	A5	+	+	Gram (-), Basil	+	-
Kaynak Suyu	A6	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A7	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A8	+	+	Gram (-), Basil	+	-
Kaynak Suyu	A9	+	+	Gram (-), Basil	+	-
Kaynak Suyu	A10	+	+	Gram (-), Basil	+	-
Kaynak Suyu	A11	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A12	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A13	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A14	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A15	+	+	Gram (-), Basil	+	-
Kaynak Suyu	A16	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A17	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A18	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A19	+	+	Gram (-), Basil	+	-
Kaynak Suyu	A20	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A21	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A22	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A23	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A24	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A25	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A26	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A27	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A28	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A29	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A30	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A31	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A32	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A33	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A34	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A35	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A36	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A37	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A38	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A39	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A40	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A41	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A42	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A43	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A44	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A45	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A46	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A47	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A48	+	+	Gram (-), Basil	+	-
Kaynak Suyu	A49	+	+	Gram (-), Basil	-	-

Kaynak Suyu	A50	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A51	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A52	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A53	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A54	+	+	Gram (-), Basil	-	+
Kaynak Suyu	A55	+	+	Gram (-), Basil	-	+
Kaynak Suyu	A56	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Kaynak Suyu	A57	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Kaynak Suyu	A58	+	+	Gram (-), Basil	-	+
Kaynak Suyu	A59	+	+	Gram (-), Basil	+	+
İçme kullanma	B1	+	+	Gram (-), Basil	-	-
İnek Sütü	C1	+	+	Gram (-), Basil	-	-
İnek Sütü	C2	+	+	Gram (-), Basil	+	+
İnek Sütü	C3	+	+	Gram (-), Basil	+	+
İnek Sütü	C4	+	+	Gram (-), Basil	-	-
İnek Sütü	C5	+	+	Gram (-), Basil	+	+
İnek Sütü	C6	+	+	Gram (-), Basil	+	+
İnek Sütü	C7	+	+	Gram (-), Basil	-	-
İnek Sütü	C8	+	+	Gram (-), Basil	+	-
İnek Sütü	C9	+	+	Gram (-), Basil	+	-
İnek Sütü	C10	+	+	Gram (-), Basil	-	-
İnek Sütü	C11	+	+	Gram (-), Basil	-	-
İnek Sütü	C12	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Koyun Sütü	D1	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Koyun Sütü	D2	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Koyun Sütü	D3	+	+	Gram (-), Basil	+	-
Koyun Sütü	D4	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Koyun Sütü	D5	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Koyun Sütü	D6	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Koyun Sütü	D7	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Koyun Sütü	D8	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Koyun Sütü	D9	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Koyun Sütü	D10	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Keçi Sütü	E1	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Keçi Sütü	E2	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Keçi Sütü	E3	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Keçi Sütü	E4	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Keçi Sütü	E5	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Keçi Sütü	E6	+	+	Gram (-), Basil	+	+
Tereyağ	F1	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Tereyağ	F2	+	+	Gram (-), Basil	-	-
Tereyağ	F3	+	+	Gram (-), Basil	+	-
Tereyağ	F4	+	+	Gram (-), Basil	+	-

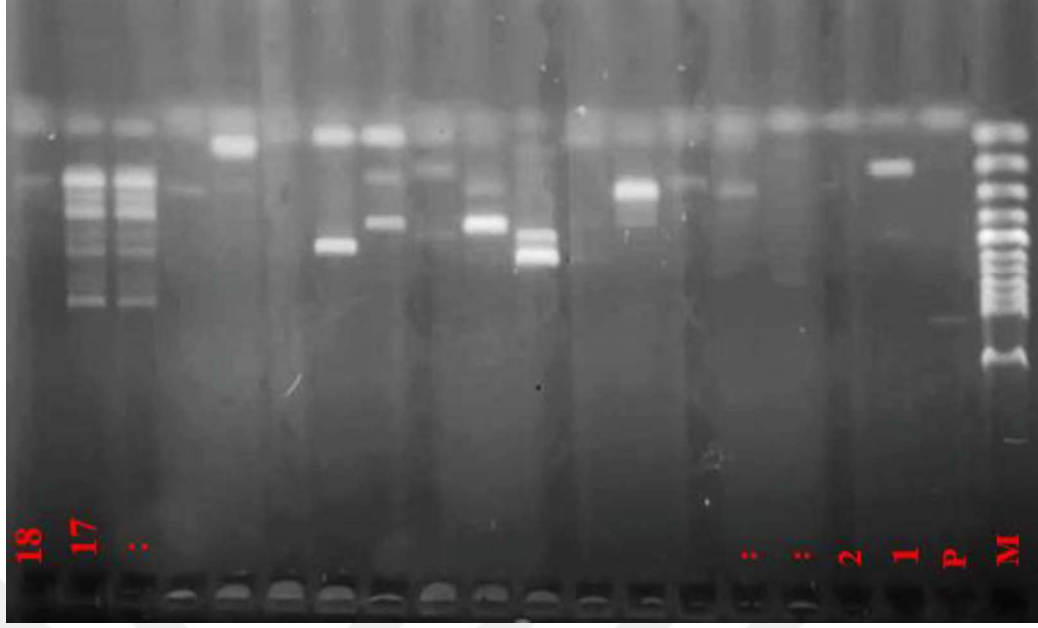
KF: Karbonhidrat Fermentasyon, NR: Nitrat Redüksiyon

4.3. Moleküler Analiz Bulguları

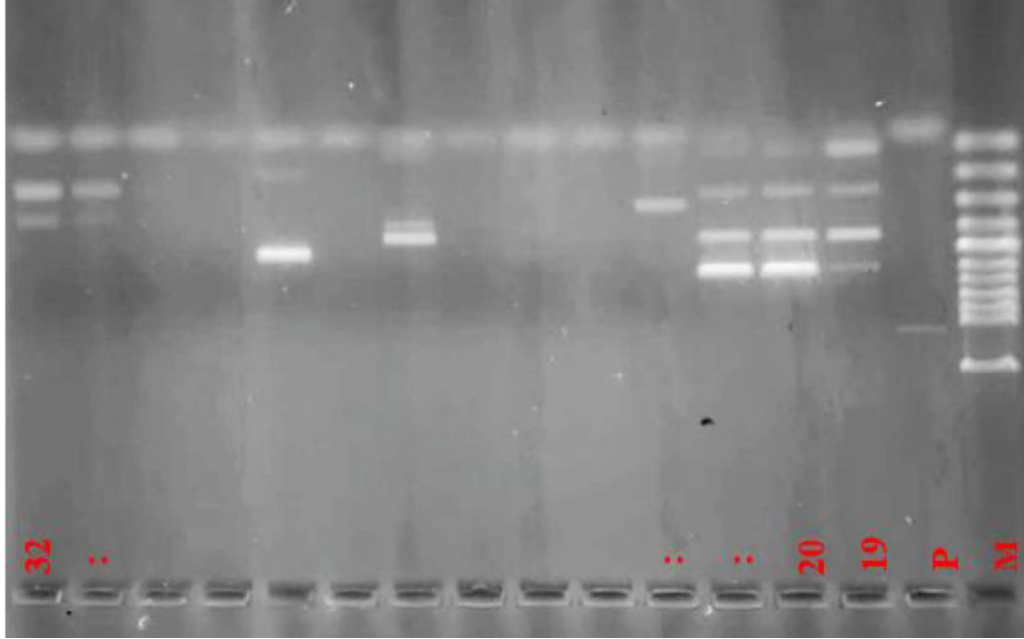
Şüpheli 34 izolatin doğrulaması, *recA* ve 16S rRNA gen bölgesine ait spesifik primerler kullanılarak PZR tekniği ile yapıldı. PZR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, izolatların hiçbirinin *recA* ve 16S rRNA genine sahip olmadığı anlaşıldı. Şüpheli izolatların 16S rRNA gen bölgesine ait elektroforez jel görüntüsü Şekil 4.2’de, *recA* gen bölgesine ait elektroforez jel görüntüsü Şekil 4.3’te, Şekil 4.4’te ve Şekil 4.5’te gösterilmiştir.



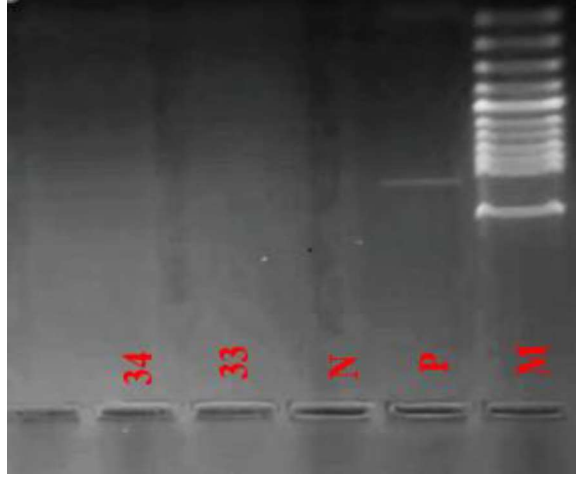
Şekil 4.2. 16S rRNA gen primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin elektroforez jel görüntüsü (M: DNA Marker, P: *Burkholderia cepacia* suşu, N: Negatif Kontrol, Aşağıdan yukarı: 1-34 no’lu izolatlar)



Şekil 4.3. *recA* gen primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin elektroforez jel görüntüsü (M: DNA Marker, P: *Burkholderia cepacia* suşu, Sağdan-sola: 1-18 no'lu izolatlar)



Şekil 4.4. *recA* gen primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin elektroforez jel görüntüsü (M: DNA Marker, P: *Burkholderia cepacia* suşu, Sağdan-sola: 19-32 no'lu izolatlar)



Şekil 4.5. *recA* gen primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin elektroforez jel görüntüsü (M: DNA Marker, P: *Burkholderia cepacia* suşu, N: Negatif Kontrol, Sağdan-sola: 33-34 no'lu izolatlar)

4.4. Çalışmada Kullanılan *B. cepacia* Suşunun Biyofilm Sonuçları

Burkholderia cepacia suşunun biyofilm testi sonucunda plaklarda oluşan biyofilmlerin optik yoğunlukları 590 nm'de ölçüldü ve absorbans değeri 0,52 olarak saptandı. Bu değere göre *B. cepacia*'da biyofilm üretimi pozitif olarak tespit edildi. *Burkholderia cepacia*'nın oluşturduğu biyofilm görüntüsü Şekil 3.11'de gösterilmiştir.

4.5. Çalışmada Kullanılan *B. cepacia* Suşunun Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları

Burkholderia cepacia suşu, 4 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılık yönünden test edildi. Değerlendirilen antibiyotiklerin zon çapları dirençli (R), duyarlı (S) ve orta derecede duyarlı (I) olarak Tablo 4.6'da gösterilmiştir (CLSI, 2018).

Tablo 4.6. *B. cepacia* kompleksi için belirlenen spesifik antibiyotikler ve zon çapları

Kullanılan Antibiyotikler	Zon Çapları (mm)		
	S	I	R
Ceftazidime (30 µg)	≥ 21	18-20	≤ 17
Meropenem (10 µg)	≥ 20	16-19	≤ 15
Minocycline (30 µg)	≥ 19	15-18	≤ 14
Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg)	≥ 16	11-15	≤ 10

Burkholderia cepacia 'nın Tablo 4.6'da gösterilen antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu tespit edildi. Antibiyotikler arasında en yüksek duyarlılık Meropenem'de, en az duyarlılık Minocycline'de gözlemlendi. Araştırmada kullanılan *B. cepacia* suşunun oluşturduğu zon çapları ve kullanılan antibiyotikler Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Çalışmada kullanılan *B. cepacia* suşunun oluşturduğu zon çapları

Kullanılan Antibiyotikler	Zon Çapları (mm)
Ceftazidime (30 µg)	27
Meropenem (10 µg)	32
Minocycline (30 µg)	19
Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75µg)	31

5. TARTIŞMA

Doğada yaygın olarak bulunan *Burkholderia cepacia* kompleks bakterileri toprak, su, bitki rizosferi ve tarım ürünleri gibi çeşitli yerlerde görülebilmektedir. Ancak bu bakterilerin çevredeki dağılımı eşit değildir. *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis*, *B. anthina* ve *B. seminalis* dünya çapında su bazlı ortamlarda yaygın olarak bulunurken *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis* ve *B. ambifaria* bitkilerin rizosferinde yaşayan türler olarak bilinmektedir. Bcc türleri sulu ortamlarda hayatta kalma ve çoğalma kapasitesine sahiptir. Bu türlerin organik maddeyi metabolize etme yeteneğinden sorumlu genetik özelliklerine sahip olmaları canlılıklarını devam ettirebilmelerinde önemli rol oynamaktadır. Bu konuyla ilgili bir diğer ipucu ise *Burkholderia* cinsine ait *Burkholderia pseudomallei*'den tahmin edilmektedir. *B. pseudomallei*, insanlarda ve hayvanlarda Melioidoz hastalığına sebep olan patojen ve endemik bir türdür. Yapılan çalışmalar neticesinde, dış zar yapısını koruma yeteneğinden dolayı *B. pseudomallei*'nin su ortamlarında uzun süreli hayatta kaldığı bildirilmiştir (Tavares ve ark., 2020).

Zanetti ve ark. (2000) tarafından İtalya'da yapılan bir çalışmada, kamu ve özel binalardan toplanan 85 içme suyu örneklerinde *B. pseudomallei* ve *B. cepacia* varlığı yönünden araştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda örneklerin %7'sinde *B. pseudomallei*, %3.5'inde *B. cepacia* saptanmıştır. Bu çalışmada, su borularında oluşan biyofilmdeki organik maddenin bakteri hücreleri tarafından metabolize edilerek mikrobiyal kontaminasyona yol açtığı dikkat çekmektedir. Vermis ve ark. (2003) tarafından Avrupa'da yapılan bir çalışmada, nehirlerden toplanan 28 su numunesi analiz edilmiş ve bunlardan 10 tanesinin Bcc'ye ait *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis* ve *B. anthina* türleri oldukları tespit edilmiştir. Çin'de Fang ve ark. (2011) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise göl sularından izole edilen 670 izolatının %40'ının *B. cepacia* kompleksine ait olduğu sonucuna varılmıştır. Araştırma sonucunda *B. cenopacepacia* en baskın tür olmakla beraber bunu *B. stabilis*, *B. multivorans*, *B. vietnamiensis* ve *B. seminalis*'in izlediği belirtilmiştir. *B. stabilis* ve *B. seminalis*'in su ortamındaki ilk raporu olması nedeniyle önem taşımaktadır. Bizim araştırmamızda, binalardan toplanan 60 adet içme kullanma suyu

ile kuyu sularından toplanan 60 adet su örneklerinin hiçbirinde Bcc türlerine rastlanmadı.

Su, kontaminasyona sebep olabilecek en yaygın ortamdır ve ilaç endüstrisinde en çok kullanılan ham maddedir. Bu durum, dünyada bazı ilaç firmaları tarafından endişeyle karşılanmaktadır. Bcc bakterileri, klinik önemi ve ilaç endüstrisinde yarattığı problemler nedeni ile Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) dikkatini çekmiştir. FDA, bu bakteri grubunun "Sakıncalı Mikroorganizmalar" kategorisine dahil edilmesi gerektiğini önermiştir. FDA 2016 yılında, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) ile iş birliği içinde, ilaç yapımı için kullanılan su sisteminde *B. cepacia*'nin varlığını tespit etmesi sonucunda bu bakteri grupları hakkında araştırmalar artmıştır. FDA 2017 yılında öksürük, soğuk algınlığı ve alerji tedavisi için kullanılan şuruplarda *B. cepacia* kontaminasyonu tespit edilmesi sonucunda ilaçların piyasadan geri çağırılmasını tavsiye etmiştir (Tavares ve ark., 2020).

B. cepacia kompleksinin çevresel ve klinik kökenli olan araştırmaları literatürde fazlasıyla mevcuttur. Ancak gıdalar üzerine yapılan araştırma sayısı yok denecek kadar azdır.

Klinik örneklerde, Bcc bakterilerinin tespit edildiği vakaların çoğunluğu genelde kontamine farmasötik ve kişisel bakım ürünlerinden kaynaklı bir etkiye sahiptir. Son zamanlarda bu bakterilerin, tıbbi ürün ve cihazlarda çok sayıda salgına neden olduğu açıklanmıştır. Shaban ve ark. (2020) 1970 ile 2019 yılları arasında literatürde yayınlanan tüm *B. cepacia* salgınlarını incelemişler ve salgınların çoğunluğunun son yıllarda arttığını ve klinik kökenli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca kontaminasyon kaynağının bilinmesinin yanında enfeksiyon kontrol ve önleme tavsiyelerinin yayınlanmasının gelecekte olası *B. cepacia* salgınları durdurabileceğini vurgulamışlardır.

Geniş bir çevresel epidemiyolojiye sahip olan Bcc bakterileriyle ilgili yapılan bir başka çalışmada Hrenovic ve ark. (2022) insan sıvı ve katı atıklarının bulunduğu ortamlardan; çöplükteki topraktan *B. multivorans*, nehir suyundan *B. cenocepacia* ile gübrelenmiş tarım topraklarından *B. amfaria* izolatlarını elde etmişlerdir. Bu

izolatların enfekte kişilerle kontaminasyonu sonucu oluşabileceğini ve insan sıvısı veya katı atıklarla çevreye yayılabileceğini ifade etmişlerdir. Yanlış bertaraf edilen atıkların yağmur sularıyla da toprağa sızmış olabileceğini bildirmişlerdir. Ibrahim ve ark. (2012) klinik, su ve tarım kaynaklarından elde ettikleri Bcc izolatlarını bazı bitki örneklerinde test ederek biyofilm oluşumlarının patojenite ile ilişkisini göstermeye çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda, klinik ve su kaynaklı izolatların bazı bitkilerde ciddi patojenite özelliği gösterdiğini ve bunun güçlü biyofilm oluşturma yetenekleriyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Burkholderia cepacia kompleksi doğal ortamdaki bitki haşere antagonistleri, bitki büyüme destekleyicileri ve toksik maddelerin parçalayıcı ajanları olarak faydalı özelliklere sahiptir. Ancak patojenik potansiyelleri bazı endişelere yol açmaktadır. Bu türlerin doğal rezervuarının araştırılıp ekolojik özelliklerinin bilinmesiyle beraber güvenilir tanımlama yöntemleri kullanılarak sağlam epidemiyolojik ve klinik verilerin toplanması, türler arasındaki çeşitliliğin aydınlatılması açısından önem taşımaktadır (Chiarini ve ark., 2006).

Burkholderia cepacia bakterilerinin sahip oldukları yüzey yapıları ile buldukları ortamda canlılıklarını koruyabilmeleri, etkenin gıda ve su kaynaklı bulaşmalara olanak sağlayacağı düşüncesini akla getirmiştir. Bu düşünce doğrultusunda yapılan bir çalışmada bakterinin gıda ve sularda bulunabilme olasılığı araştırılmıştır. Araştırma sonucunda etkenin hayvansal ürünlerde kontaminasyona bağlı olarak bulunması, gıda ve suların *B. cepacia* yönünden potansiyel yeni bir kaynak olabileceğini göstermektedir (Moore ve ark. 2001).

Türkiye’de yapılan gıda ve sularla ilgili *B. cepacia*’nın varlığının belirlenmesine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Dünya’da yapılan mevcut bir yayında, *B. cepacia* bakterilerini pişmiş et, domuz, sığır, kuzu ve tavuk eti, deniz ürünleri, süt ürünleri, çiğ süt, yumurta, pirinç ve salatalar, sebze ile meyveler olmak üzere 8 ayrı gıda kategorisinde ve 9 ayrı su kategorisinde analiz ederek sonuçları rapor etmişlerdir. Sadece çiğ sütün bu mikroorganizmalar için varlığını tespit etmişlerdir. Bu nedenle çiğ süt tüketiminin, bu organizma ile potansiyel enfeksiyon kaynağı oluşturacağı düşünülmektedir (Moore ve ark. 2001).

Çiğ sütün, *B. cepacia* kompleksinin çevresel bir kaynağı olduğu bilinmekle beraber bu bakterilerin çiğ sütte çoğalma kabiliyeti hakkında hiçbir veri mevcut değildir. Literatür taramalarında Bcc türlerinin çiğ süt ile ilişkili olduğu sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Berriatua ve ark. (2001) mikrobiyolojik ve epidemiyolojik araştırmalarında mastitise sebep olan etken maddenin koyun sütlerindeki *B. cepacia* kompleksine ait olduğunu saptamışlardır. Ayrıca bu çalışmanın, koyunlarda görülen mastitisin Bcc kompleksi ile ilişkili olduğu ilk rapor olma özelliğinden dolayı veterinerlik ve tıpta önemli çıkarımlara sahip olduğunu vurgulamışlardır. Başka bir araştırmada Nörnberg ve ark. (2010) çiğ süt örneklerinden izole ettikleri psiktrofik *B. cepacia*'nın yüksek düzeyde proteolitik aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemişler ve çiğ sütteki kontaminasyonun memenin toprakla teması sonucu ya da süt tanklarının toz yoluyla olabileceğine dikkat çekmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, Burdur ili ve ilçelerinden toplanan süt, süt ürünleri ile su örneklerinden, *B. cepacia*'nın kültürel ve moleküler identifikasyonu yapılarak elde edilen izolatların biyofilm oluşumları ile antibiyotik duyarlılıkları incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla, tüm gıda örneklerinden *B. cepacia* izolasyonu için önerilen kültür yöntemi kullanılarak izolasyon gerçekleştirildi. *B. cepacia* varlığı yönünden şüpheli olduğu düşünülen izolatlar biyokimyasal testlerle tanımlanarak PZR yöntemi ile doğrulaması yapıldı. PZR sonuçlarına göre tüm şüpheli izolatlar negatif olarak tespit edildi. Ve izolatların hiçbirinde *recA* ve 16S rRNA genlerine rastlanmadı.

Türkiye'de gıda ve su örneklerinde *Burkholderia cepacia* varlığının mikrobiyolojik ekim yöntemlerinin yetersiz olması sebebiyle moleküler yöntemler kullanılarak doğrulama işleminin yapıldığı ilk çalışma olmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada analiz sonuçları değerlendirildiğinde, gıda örneklerinde *B. cepacia* varlığı tespit edilmemiştir. Ancak *B. cepacia* kompleks bakterileri çevresel bir epidemiyolojiye sahip olduğu gibi hastane ortamlarında da sıklıkla bulunabilmektedir. Bu duruma paralel olarak hastane enfeksiyonları oluşmakta ve salgınlar meydana gelebilmektedir. Yapılan son çalışmalarda, çiğ sütlerde *B. cepacia* bakterilerinin saptanmasına bağlı olarak bireylerde enfeksiyon gelişme olasılığı bulunmaktadır. Bu bağlamda gıda yönünden de salgınların oluşabileceği akılda tutularak mikrobiyolojik bulaşmayı önleyici tedbirler geliştirilmelidir. Halk sağlığı açısından son yıllarda problem haline gelen *B. cepacia* kompleksine karşı alınacak önlemler şöyle sıralanabilir:

- Çevresel kontaminasyon önlenmeli,
- Kişisel hijyene gereken önem verilmeli,
- Başta yoğun bakım üniteleri olmak üzere bağışıklık sistemi zayıf hastaların yattığı birimlerde temas önlenmeli,
- Personel ve hasta kişilere gerekli eğitimler verilmeli,
- Enfeksiyon kontrol önlemleri oluşturulmalı,
- Güvenilir sürveyans çalışmaları yapılmalı,
- Uygun antibiyotik politikaları geliştirilmeli,
- Gıdalarda *B. cepacia* izolasyonlarında mikrobiyolojik ekim yöntemleri ile kesin sonuç alınamamasından dolayı moleküler yöntemlerle doğrulaması yapılmalı,
- Hayvan yetiştiricileri, tarımda çalışanlar ve tüketiciler hijyen konusunda bilinçlendirilmeli ve kişilere gerekli eğitimin verilmesi sağlanmalı,
- Etkenin, özellikle riskli grupların sağlığını tehdit ettiği yönündeki uyarılar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

Altay Ö (2019). *Burkholderia türlerinin moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi, türler arasında biyofilm oluşumu ve antibiyotik direnç farklılığının belirlenmesi.* Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara/Türkiye.

Anonim (2022). *Genel İdentifikasyon Testleri.*
<http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/210013601.pdf>. (Erişim Tarihi: 14.09.2022)

Bach E, Sant Anna FH, Magrich Dos Passos JF, Balsanelli E, Baura VA, Pedrosa FO (2017). 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.*, **31**, 75(6).

Baltimore (2006). 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 textboo of Diagnostic Microbiology.* USA: Lippincott Williams Publishers, p: 303-91.

Baylan O (2012). Bağışıklığı baskılanmış hastalarda sıklıkla saptanan bir fırsatçı patojen: *Burkholderia cepacia* Kompleksi. *Mikrobiyol Bul.*, **46(2)**, 304-318.

Berriatua E, Ziluaga I, Miguel Virto C, Uribarren P, Juste R, Laevens S, Vandamme P, Govan JR (2001). Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with *Burkholderia cepacia* complex infection. *Journal of clinical microbiology*, **39(3)**, 990–994.

Binner DH (2006). *Klinik Örneklerden Burkholderia Cepacia Kompleksinin PZR tabanlı identifiasyonu,* Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Burholder WH (1950). Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*, **40**, 115.

Campbell PW, Phillips JA, Heidecker GJ, Krishnamani MR, Zahorchak R, Stull TL (1995). Detection of *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* using PZR. *Pediatric pulmonology*, **20(1)**, 44–49.

Chiarini L, Bevivino A, Dalmastrri C, Tabacchioni S, Visca P (2006). *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends in microbiology*, **14(6)**, 277–286.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2018). *Zone Diameter and MIC Breakpoints for Burkholderia cepacia complex.*
<https://clsi.org/search/?f=sw&q=M100+Performance+Standards+for+Antimicrobial+Susceptibility+Testing> (Erişim Tarihi: 08.05.2020)

Coenye T, Laevens S, Willems A, Ohlen M, Hannant W, Gowan JR, Gillis M, Falsen E, Vandamme P (2001). *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*, **51(Pt3)**, 1099-1107.

Coenye T, Vandamme P, Govan JR, LiPuma JJ (2001). Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol*, **39**, 3427-3436.

Demir S, Fidan F, Değirmenci B, Özer Y, Gökçe Ç (2005). Bir hemodiyaliz hastasında invazif aspergillozu taklit eden *Burkholderia cepacia* pnömoni olgusu. *Turk Toraks Derg.*, **6(2)**, 175-7.

Drevinek P, Mahenthiralingam E (2010). *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect.*, **16(7)**, 821-30.

Erol İ (2007). *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Ankara: Pozitif Matbaacılık, s: 20

Fang Y, Xie GL, Lou MM, Li B, Muhammad I (2011). Diversity analysis of *Burkholderia cepacia* complex in the water bodies of West Lake, Hangzhou, China. *Journal of microbiology*, **49(2)**, 309–314.

Gillis M, Van TV, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Fernandez MP (1995). Polyhasic 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*, **45**, 274-289.

Henry DA, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Coenye T, Speert DP (2001). Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol*, **39**, 1073-1078.

Horasanlı S, Tolun V, Küçüker MA (1997). İdrardan izole edilen *Burkholderia cepacia* suşları. *İnfeksiyon Dergisi*, **11(4)**, 385-7.

Hrenovic J, Seruga Music M, Drmic M, Pesorda L, Bedenic B (2022). Characterization of *Burkholderia cepacia* complex from environment influenced by human waste. *International journal of environmental health research*, **32(9)**, 2112–2122.

Ibrahim M, Tang Q, Shi Y, Almoneafy A, Fang Y, Xu L, Li W, Li B, Xie GL (2012). Diversity of potential pathogenicity and biofilm formation among *Burkholderia cepacia* complex water, clinical, and agricultural isolates in China. *World journal of microbiology & biotechnology*, **28(5)**, 2113–2123.

Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, Levison H (1984). Pseudomonas cepacia infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *The Journal of pediatrics*, **104(2)**, 206-210.

Jin Y, Zhou J, Zhou J, Hu M, Zhang Q, Kong N, Yue J (2020). Genome-based classification of *Burkholderia cepacia* complex provides new insight into its taxonomic status. *Biology Direct*, **15(1)**, 1-14.

Leitao JH, Sousa SA, Ferreira AS, Ramos CG, Silva IN, Moreira LM (2010). Pathogenicity, virulence factors and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. *Appl Microbiol Biotechnol*, **87(1)**, 31-40.

LiPuma JJ, Currie BJ, Lum GD, Vandamme PAR (2007). *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoreae*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delfia* and *Acidovorax*. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical Microbiology. Washington, DC:ASM Press.

Liao CH, Chang HT, Lai CC, Huang YT, Hsu MS, Liu CY, Yang CJ, Hsueh PR (2011). Clinical characteristics and outcomes of patients with *Burkholderia cepacia* bacteremia in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **70(2)**, 260-6.

Lynch KH, Dennis JJ (2008). Development of a species-specific *fur* gene-based method for identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol*, **46(2)**, 447-55.

Madıgan MT ve Martıno JM (2010). Mikroorganizmaların Biyolojisi. 11. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, E8-E9.

Mahenthalingam E, Baldwin A, Dowson CG (2008). *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol*, **104(6)**, 1539-51.

McDowell A, Mahenthalingam E, Moore JE, Dunbar KE, Webb AK, Dodd ME, Martin SL, Millar BC, Scott CJ, Crowe M, Elborn JS (2001). PZR-based detection and identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology*, **39 (12)**, 4247–4255.

Moore JE, McIlhatton B, Shaw A, Murphy PG, Elborn JS (2001). Occurrence of *Burkholderia cepacia* in Foods and Waters: Clinical Implications for Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Food Protection*, **64(7)**, 1076-1078.

Nörnberg MD, Friedrich RS, Weiss RD, Tondo EC, Brandelli A (2010). Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, **63**, 41-46.

Öztürk R (2008). Çoklu ilaç dirençli *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* ile oluşan infeksiyon hastalıklarında antimikrobik tedavi. *ANKEM*, 22(Ek2), 36-43.

Palleroni NJ, Holmes B (1981). *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol*, **31(4)**, 479-81.

Ragupathi NKD and Veeraraghavan B (2019). Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, **18(1)**, 7.

Rosenberg E, Delong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (2014). The Prokaryotes. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Qinn JP (1998). Clinical problems posed by multiresistant non-fermenting gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis.*, **27**, 117-24.

Sfeir MM (2018). *Burkholderia cepacia* complex infections: more complex than the bacterium name suggest. *Journal of Infection*, **77(3)**, 166-170.

Shaban RZ, Sotomayor Castillo C, Nahidi S, Li C, Macbeth D, Mitchell BG, Russo PL (2020). Global burden, point sources, and outbreak management of healthcare-associated *Burkholderia cepacia* infections: An integrative review. *Infection control and hospital epidemiology*, **41(7)**, 777–783.

Sousa SA, Ramos CG, Leitao JH (2011). *Burkholderia cepacia* Complex: Emerging Multihost Pathogens Equipped with a Wide Range of Virulence Factors and Determinants. *Int J Microbiol*, pii: 607575.

Stern NJ, Line JE, Chen HC (2001). *Campylobacter*. In: Downes FP, Ito K. (Eds), Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods. Washington: The American Public Health Association, p: 301-310.

Şener B (2002). Kistik fibroziste mikrobiyal patogenezi. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **33(1)**, 49-57.

Terzi Ö, Dündar C (2020). Ülkemizde son 10 yılda içme ve kullanma suyu ile ilişkili üretilen tezlerin niteliksel değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, **77(EK-4)**, 211-218.

Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R ve Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kersters K, Govan JR (1997). Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patient and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, **47(4)**, 1188-1200.

Vermis K, Coenye T, Mahenthiralingam E, Nelis HJ, Vandamme P (2002). Evaluation of species-specific *recA*-based PZR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Medical Microbiology*, **51(11)**, 937-940.

Vermis K, Brachkova M, Vandamme P, Nelis H (2003). Isolation of *Burkholderia cepacia* complex genomovars from waters. *Systematic and applied microbiology*, **26(4)**, 595–600.

Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M (1992). 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*, **36(12)**, 1251-75.

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.:proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov. *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb.nov. *Microbiol Immunol*, **39(11)**, 897-904.

Yavuz O (2017). *Burdur gölü'nden izole edilen mikroorganizmaların ağır metal ve antibiyotik dirençliliğinin kültürel ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi.* Yüksek Lisans Tezi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Burdur/Türkiye.

Zahariadis G, Levy MH, Burns JL (2003). Cepacia-like syndrome caused by *Burkholderia multivorans*. *Can J Infect Dis.*, **14(2)**, 123-5.

Zanetti F, De Luca G, Stampi S, (2000). Recovery of *Burkholderia pseudomallei* and *B. cepacia* from drinking water. *International journal of food microbiology*, **59(1-2)**, 67–72.

