

Kistik Fibrozisli ve Kistik Fibrozisi Olmayan Hasta Grubunda *Burkholderia* Türlerinin Multilokus Sekans Analizi, Biyofilm Oluşturma, Antibiyotik Duyarlılık ve Sinerji Testleri

Multilocus Sequence Analysis, Biofilm Production, Antibiotic Susceptibility and Synergy Tests of *Burkholderia* Species in Patients with and without Cystic Fibrosis

Özlem AKIŞOĞLU¹, Doruk ENGİN², Seyyide SARIÇAM³, Hamit Kaan MÜŞTAK³, Burçin ŞENER¹, Gülşen HASÇELİK¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

² Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara, Turkey.

³ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Ankara University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından (Proje no: THD-2016-10613) desteklenmiş ve çalışmanın ön verileri 117th General Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, Louisiana ABD (1-5 Haziran 2017)'de ve 18th International Congress on Infectious Diseases, Buenos Aires, Argentina (ICID) (1-4 Mart 2017)'da poster olarak sunulmuştur.

Makale Atfı: Akişoğlu Ö, Engin D, Sarıçam S, Müştak HK, Şener B, Hasçelik G. Kistik Fibrozisli ve Kistik Fibrozisi Olmayan Hasta Grubunda *Burkholderia* Türlerinin Multilokus Sekans Analizi, Biyofilm Oluşturma, Antibiyotik Duyarlılık ve Sinerji Testleri. Mikrobiyol Bul 2019;53(1):22-36

ÖZ

Burkholderia türleri bağışıklığı baskılanmış insanların, özellikle kistik fibrozisli (KF) hastaların solunum yollarında enfeksiyona neden olan önemli patojenlerdir. Bu bakterilerin tedavisinde; geleneksel yöntemlerle yapılan tanımlamada sorunların bulunması, birden fazla antibiyotiğe karşı içsel direnç göstermeleri ve biyofilm oluşturmaları nedeniyle güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu çalışmada, KF ve KF olmayan hastalardan izole edilen *Burkholderia* türlerinin rutin mikrobiyolojik yöntemler, matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) ve multilokus sekans analizi (MLSA) ile tanımlanması, biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi, antibiyotik direnç ve sinerjilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 26 farklı hastadan izole edilen 38 adet *Burkholderia* spp. (25 KF, 13 KF olmayan) fenotipik testler, MALDI-TOF MS ve MLSA ile tanımlanmıştır. İzolatların sekans tipleri PubMLST veri tabanı kullanılarak belirlenmiştir. Klinik izolatların biyofilm oluşturma özellikleri mikropak yöntemi ile çalışılmış, seftazidim, meropenem, trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SXT) ve levofloksasinin duyarlılıkları, CLSI (2017) rehberine göre mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sinerji testleri dama tahtası yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Multilokus sekans analizinde çalışılan klinik izolatlar *Burkholderia cenocepacia* (n= 16), *Burkholderia contaminans* (n= 11), *Burkholderia gladioli* (n= 4), *Burkholderia dolosa* (n= 4), *Burkholderia mul-*

İletişim (Correspondence): Dr. Özlem Akişoğlu, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. Tel (Phone): +90 312 305 1560, E-posta (E-mail): hoaltay@gmail.com

tivorans (n= 2) ve *Burkholderia seminalis* (n= 1) olarak belirlenmiştir. Bu izolatların sekans tipleri ST19, ST72, ST102, ST180, ST482, ST602, ST629, ST740, ST839 ve ST1392 olarak saptanmıştır. MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde doğru tanımlama *B. contaminans* haricindeki tüm isolatlar için %94-100 arasında bulunmuştur. Çalışmaya dahil edilen isolatlarda biyofilm yapımı %53 (n= 20) olarak belirlenmiştir ve türler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ayrıca KF (%56, n= 14/25) ve KF olmayan (%46, n= 6/13) hastalardan izole edilen *Burkholderia* izolatlarının biyofilm yapımı arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır (p> 0.05). İzolatların seftazidim, meropenem, TMP-SXT ve levofloksasine karşı duyarlılık yüzdeleri sırasıyla %66, %34, %50 ve %60 olarak bulunmuştur. *Burkholderia* türlerinin antibiyotik direnci değerlendirildiğinde, KF hastalarından elde edilen isolatlar seftazidime daha duyarlı bulunurken, diğer antibiyotikler için anlamlı fark saptanmamıştır. İki izolatta meropenem ve TMP-SXT arasında sinerji gözlenmiştir. On beş izolatta antagonizma tespit edilmiş, bunun 12'si meropenem ile seftazidim, 3'ü seftazidim ile TMP-SXT arasında bulunmuştur. Bu bakteri grubunda görülen yüksek antibiyotik direncine neden olan birçok direnç mekanizması olmakla birlikte, bu çalışmada saptanan meropenem ve seftazidim arasındaki antagonizma β -laktamazların ekspresyonuna bağlanabilir. Bu çalışma, KF ve KF olmayan hastalarda izole edilen *Burkholderia* spp. dizi analizi sonuçlarındaki farkı, 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.

ABSTRACT

Burkholderia spp. emerged as important pathogens in the airways of immunocompromised humans, especially those with cystic fibrosis (CF). Failure of identification with conventional techniques, high intrinsic resistance to most antibiotics and biofilm formation can cause difficulties in the treatment of these infections. The aim of this study was to identify *Burkholderia* spp. strains isolated from CF and non-CF patients with routine microbiological methods, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and multilocus sequence analysis (MLSA), to determine of the antibiotic susceptibility and synergies, and to evaluate biofilm formation of these isolates. A total of 38 *Burkholderia* spp. (25 CF, 13 non-CF) from 26 patients were identified by biochemical, phenotypic and matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and sequence types were revealed by multilocus sequence analysis (MLSA). Sequence types of isolates were identified using the PubMLST database. Characteristics of biofilm formation of clinical isolates were evaluated by microplate method. Antibiotic susceptibilities of ceftazidime, meropenem, trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SXT) and levofloxacin were determined by broth microdilution method according to CLSI (2017) guidelines. Synergy tests were performed by checkerboard method. Clinical isolates were identified as *Burkholderia cenocepacia* (n= 16), *Burkholderia contaminans* (n= 11), *Burkholderia gladioli* (n= 4), *Burkholderia dolosa* (n= 4), *Burkholderia multivorans* (n= 2) and *Burkholderia seminalis* (n= 1). Sequence types of these isolates were determined as ST19, ST72, ST102, ST180, ST482, ST602, ST629, ST740, ST839 and ST1392. The correct identification at the species-level with MALDI-TOF MS was 94-100% for all isolates except *B. contaminans*. Biofilm formation among the identified species in the study was determined as 53% (n= 20). There was no statistical difference when the biofilm production was evaluated separately among *Burkholderia* species and biofilm production rates between CF (56%, 14/25) and non-CF (46%, 6/13) *Burkholderia* isolates (p> 0.05). Overall rates of resistance to ceftazidime, meropenem, TMP-SXT, and levofloxacin of the isolates were 35%, 66%, 50% and 40%, respectively. The 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 was determined between meropenem and TMP-SXT in two isolates. Antagonism was detected in 15 isolates, 12 of them were between meropenem and ceftazidime, three of them were between ceftazidime and TMP-SXT. Numerous resistance mechanisms may lead to higher resistance in this bacteria, whereas the antagonism between meropenem and ceftazidime in this study might be attributed to the expression of beta-lactamases. In this study, the distinctness of sequence types between *Burkholderia* spp. isolated from CF and non-CF patient, provided a better understanding about the importance of biofilm formation for the infections with these bacteria and emphasized that the management of therapy should be driven by the antibiotic test results.

Keywords: *Burkholderia* spp.; multilocus sequence analysis; biofilm; antibiotic susceptibility tests.

GİRİŞ

Burkholderia türleri doğada yaygın olarak bulunan, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi morbidite ve mortaliteye neden olabilen, aerobik, gram-negatif, non-fermenter basillerdir. *Burkholderia* cinsi taksonomik olarak *Betaproteobacteria* sınıfı içinde, *Burkholderiaceae* ailesinde bulunmaktadır. Günümüzde bu cins altında 100'den fazla tür bulunmaktadır. *Burkholderia cepacia* kompleksi (Bcc)'nin moleküler ve biyokimyasal testlerle genomik olarak yakın ilişkili 22 türden oluşan bir küme olduğu gösterilmiştir¹ (Tablo I).

B.cepacia kompleksi 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. KF hastalarında en sık görülen Bcc türlerini inceleyen epidemiyolojik çalışmalarda, hastalığa neden olan tür ve antibiyotik duyarlılıklarının farklı olduğu ve ülkeler arası farklılıklarının da bulunduğu saptanmıştır². 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 destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon 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, günümüzde kullanılan tüm hücre protein elektroforezi, 16S rRNA gen sekansı, recA geni bazlı analizler, multilokus sekans analizi (MLSA), tüm genom dizi analizi, *fur* ve *hisA* gen dizisi analizi gibi yöntemlerin her birinin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar arasında yer alan MLSA, yakın türlerin ayrımı için kullanılan, birden çok lokusun dizilenmesi esaslı güvenilir bir moleküler sınıflandırma yöntemidir³.

Tablo I. *Burkholderia cepacia* Kompleks Sınıflaması

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

Burkholderia türlerinin hastalık oluşturabilme yeteneği ve tedaviye yanıtı türler arasında farklılık 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 gelmektedir⁴.

Burkholderia türleri aminoglikozidler, sefalosporinler, antipsödomonal penisilinler 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 göstermektedir⁵.

Bu çalışmada, KF ve KF olmayan hastalardan izole edilen *Burkholderia* türlerini rutin mikrobiyolojik yöntemlerle ve multilokus sekans analizi ile tanımlamak, izolatlarda biyofilm oluşumunu, antibiyotik duyarlılık durumunu ve kombine antibiyotik sinerjisini değerlendirme amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 16.12.2015 ve Karar no: GO 15/797-35).

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Birimi'nde 2007-2017 yılları arasında KF ve KF olmayan erişkin ve çocuk hastalardan izole edilen ve 127 bakteri çalışmaya alındı. Bu bakteriler geleneksel mikrobiyolojik yöntemler ve MALDI-TOF MS ile yeniden tanımlandı ve 90 adetinin *Burkholderia* türü olduğu saptandı. Aynı hastadan bir yıl içinde izole edilen aynı tür bakteriler çalışmadan çıkarılarak, çalışmanın ileri aşamalarına (MLSA, biyofilm, antibiyotik duyarlılık ve sinerji testleri) toplam 38 izolatla devam edildi. Hastaların tanıları Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'nde takip edilen hastaların hasta kayıt sisteminde bulunan ICD kodları doğrultusunda belirlendi.

Bakteri İzolatlarının Rutin Yöntemlerle Tanımlanması

Bakteriler kanlı agar besiyerine iki defa pasajlandı ve gram-negatif, non-fermenter, hareketli, oksidaz ve katalaz pozitif, indol negatif olan bakteriler çalışmaya alındı. Bu izolatların tür düzeyinde tanımlanması MALDI-TOF MS (Bruker Daltonic, Bremen, Almanya) ile değerlendirildi. Spektrumlar Flex Control 3.0 yazılımı MALDI Biotyper 3.1 veri tabanı kütüphanesi (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanılarak analiz edildi. Üretici firma önerilerine göre tanımlama skoru ≤ 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 iyi tanımlamayı gösterdi. Tanımlamada skoru ≤ 2 olan izolatlara etanol-formik asit ekstraksiyon protokolü uygulanarak analiz tekrar edildi.

Bakteri İzolatlarının Multilokus Sekans Analizi ile Tanımlanması

Çalışmada *Burkholderia* türlerinin moleküler karakterizasyonunda MLSA yöntemi kullanıldı⁶. Bu amaçla, PubMLST veri tabanında belirtilen; ATP synthase beta chain (*atpD*, 756 bp), Glutamate synthase large subunit (*gltB*, 652 bp), DNA Gyrase subunit B (*gyrB*, 738 bp), Recombinase A (*recA*, 975 bp), GTP binding protein (*lepA*, 525 bp), Acetoacetyl-CoA reductase (*phaC*, 704 bp) ve Tryptophan synthase subunit B (*trpB*, 787 bp) "housekeeping" genleri PCR ile çoğaltılarak dizilendi. Bu genlerin çoğaltılması ve dizilenmesinde PubMLST (www.pubmlst.org) veri tabanında önerilen primer dizileri kullanıldı. Belirtilen genler BigDye Direct Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile üretici firmanın önerdiği şekilde iki yönlü çoğaltılarak ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında dizilendi. Elde edilen tüm diziler CLC Main Workbench v.7.7.3. (Qiagen, ABD) ile analiz edilerek PubMLST veritabanındaki referans dizilerle karşılaştırıldı. Her gen için allel profili belirlendi ve elde edilen allellerin kombinasyonunun PubMLST veri tabanı (01 Ağustos 2018) ile karşılaştırılması sonucu izolatlar tür düzeyinde tanımlandı ve sekans tipleri belirlendi.

Mikroplak Yöntemi ile Biyofilm Oluşumunun Değerlendirilmesi

Çalışmada izole edilen 38 *Burkholderia* türünün biyofilm oluşumu O'Toole ve arkadaşları⁷ tarafından tanımlanan kristal viyole mikroplak ölçüm yöntemi ile değerlendirildi. *Burkholderia* türlerinin biyofilm oluşumu için 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 kullanıldı. Bu yöntemde, Luria-Bertani broth (LB) içinde bir gece inkübe edilen bakteriler yukarıda tarif edilen besiyeri içinde 0.5 OD₆₀₀ olacak şekilde süspanse edildi, bu çözeltiden 20 µl alınarak 180 µl aynı besiyeri içeren 96 kuyucuklu U tabanlı mikroplaklara dağıtıldı. Deney koşulları her bakteri için altı kuyucuk kullanılarak tekrarlandı. Mikroplaklar 37°C'de 48 saat aerobik koşullarda inkübe edildikten sonra tutunamayan hücrelerin uzaklaştırılması için iki defa su küvetine hafifçe daldırılarak yıkandı. Her bir kuyucuğa 125 µL %0.1'lik kristal viyole boyası dağıtıldı. Plaklar 10-15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, fazla boyanın uzaklaştırılması için dört defa su küvetine hafifçe daldırılarak yıkandı. Kristal viyolenin çözülmesi amacıyla her bir kuyucuğa 125 µL %33'lük asetik asit dağıtıldı. Plaklar 10-15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra çözülen kristal viyole düz tabanlı mikroplaklara aktarıldı. Absorbans değeri plak okuyucu kullanılarak 600 nm'de ölçüldü. Optik dansitelerine (OD) göre izolatlarda biyofilm oluşumu belirlendi. 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): güçlü biyofilm oluşumu olarak kabul edildi.

İn vitro Antibiyotik Testleri ve Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlılıkların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda güncel tedavide kullanılan antibiyotiklerin (meropenem, seftazidim, trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ) ve levofloksasin) minimal inhibitör konsantras-

yonları (MİK) sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle CLSI rehberleri doğrultusunda belirlendi⁸. Bu amaçla trimetoprim (Sigma-Aldrich, Almanya), sülfametoksazol (Sigma-Aldrich, Almanya), seftazidim (Sigma-Aldrich, Almanya), meropenem (Sigma-Aldrich, Almanya) ve levofloksasin (Sigma-Aldrich, Almanya) antibiyotiklerinin toz şekilleri CLSI'nın önerilerine göre stok solüsyonları ve sulandırılmaları hazırlandı. Daha sonra bu antibiyotikler için MİK değerleri katyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyeri (BD BBL Mueller Hinton II Broth, ABD) kullanılarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 96 kuyucuklu mikroplakta çalışıldı. Plak üzerinde antibiyotik içermeyen pozitif kontrol kuyucuğu ve bakteri içermeyen negatif kontrol kuyucuğu kullanıldı; kalite kontrol suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı. Sonuçlar CLSI önerilerine göre değerlendirildi. Orta duyarlı olarak belirlenen izolatlar değerlendirmede dirençli olarak kabul edildi.

Çalışmada kullanılan antibiyotik kombinasyonlarının sinerjik etkisi dama tahtası yöntemi ile çalışıldı. 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 plak üzerinde test edildi. Plak üzerinde her iki ilacın MİK değerleri dama tahtası testi ile eş zamanlı olarak tekrar çalışıldı; elde edilen sonuçlar, ilk çalışılan MİK değerleri ile karşılaştırıldı ve sinerji testleri yorumlanırken eş zamanlı olarak çalışılan MİK değerleri kullanıldı. Test edilen iki ilacın farklı konsantrasyonları ve son bakteri inokulum konsantrasyonu 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde bakteri süspansiyonu kuyucuklara aktarıldı; $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 20 saatlik inkübasyondan sonra plaklar gözle değerlendirildi. Sonuçların değerlendirilmesinde kombinasyon plağındaki üreme olmayan tüm kuyucuklar taranarak, en düşük FİK (fraksiyonel inhibitör konsantrasyon) indeksinin hesaplandığı kuyucuk değerlendirmeye alındı. $\text{FİK} = (\text{MİK A kombinasyon} / \text{MİK A}) + (\text{MİK B kombinasyon} / \text{MİK B})$ olarak hesaplandı. $\text{FİK} \leq 0.5$ sinerjistik etkileşim, $\text{FİK} > 4$ antagonistik etkileşim ve $0.5 < \text{FİK} \leq 4$ etkileşim yok olarak değerlendirildi.

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, $p \leq 0.05$ olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Burkholderia spp. olarak tanımlanan ve çalışmaya alınan 38 izolat multilokus sekans analizi, biyofilm oluşturma deneyleri ve tekli ve kombine antibiyotik duyarlılık testleri yönünden değerlendirilmiştir. Çalışmaya 26 farklı hastaya ait (13 KF, 13 KF olmayan) 38 izolat alınmıştır. Bu bakterilerin 25'i KF, 13'ü KF olmayan hastalardan elde edilmiştir.

KF tanısı alan hastaların (n= 13) tamamı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Göğüs Hastalıkları Ünitesi tarafından takip altında olan hastalardır. KF olmayan hastaların (n= 13) çalışmada değerlendirilen örneklerin alındığı tarihte kolon kanseri (n= 2), akciğer kanseri, meme kanseri, nöro-dejeneratif hastalık,

multiple miyelom, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, osteomiyelit, piyomiyozit, sinir sisteminin dejeneratif hastalığı, böbrek taşı, veziko-üretal reflü ve prostat büyümesi tanıları ile takip edilen hastalar olduğu görülmüştür.

KF'li hastalardan elde edilen klinik örneklerin 23'ünün balgam, birinin kan ve birinin derin trakeal aspirat olduğu tespit edilmiştir. KF olmayan hastalardan elde edilen klinik örneklerin beşi kan, dördü idrar, biri derin trakeal aspirat, biri balgam, biri püye ve biri kateter ucundan alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilen klinik isolatlar içinde multilokus sekans analizine göre en fazla tanımlanan tür *B.cenocepacia* (n= 16, %42) olarak saptanmıştır. Bu türü *Burkholderia contaminans* (n= 11, %29) izlemiştir. Tanımlanan diğer türler sırasıyla *Burkholderia gladioli* (n= 4, %11), *Burkholderia dolosa* (n= 4, %11), *Burkholderia multivorans* (n= 2, %5) ve *Burkholderia seminalis* (n= 1, %2) olarak tespit edilmiştir. Multilokus sekans analizi sonuçlarına göre KF hastalarından izole edilen¹³ *B.cenocepacia* izolatının iki hastaya ait altısının ST839, üç hastaya ait dördünün ST1392 ve bir hastaya ait üçünün ST602 olduğu tespit edilmiştir. KF olmayan hastalardan izole edilen üç *B.cenocepacia* izolatının ikisi ST602 ve biri ST740 olan farklı hastalarda gözlenmiştir. Dört farklı KF hastasından *B.contaminans* olarak tespit edilen altı izolatın tamamının sekans tipi ST102 olarak saptanmıştır. KF olmayan hastalara ait beş *B.contaminans* izolatının dördü ST482 ve biri ST102 olarak tespit edilmiş olup, bunların tamamın farklı hastalar olduğu gözlenmiştir. İki farklı KF hastasından izole edilmiş dört *B.gladioli* izolatından üçü ST629 olup, bir hastaya ait olduğu; diğerinin ise mevcut veri tabanındaki sekans tipleri ile eşleşmediği saptanmıştır. Değerlendirilen iki *B.multivorans* izolatının aynı KF hastasına ait olduğu ve sekans tipinin ST19 olduğu saptanmıştır. *B.dolosa* izolatları KF olmayan dört farklı hastadan izole edilmiş olup tamamının sekans tipi ST72 olarak bulunmuştur. *B.seminalis* ise KF olmayan bir hastaya ait olmakla beraber sekans tipi ile eşleşen izolat mevcut veritabanında bulunamamıştır (Tablo II).

Multilokus sekans analizi sonuçları referans olarak kabul edildiğinde MALDI-TOF MS ile *B.cenocepacia* izolatlarının %94 (n= 15/16)'ünün tür düzeyinde doğru tanımlandığı, bir izolatın ise *B.vietnamiensis* olarak hatalı tanımlandığı görülmüştür. MLSA ile

Tablo II. KF ve KF Olmayan Hastalardan İzole Edilen *Burkholderia* Türlerinin MLSA Sonuçları

MLSA sonucu	KF (sekans tipi)	KF olmayan (sekans tipi)
<i>B.cenocepacia</i> (n= 16)	6 (ST839), 4 (ST1392), 3 (ST602)	2 (ST602), 1 (ST740)
<i>B.contaminans</i> (n= 11)	6 (ST102)	4 (ST482), 1 (ST102)
<i>B.gladioli</i> (n= 4)	3 (ST629), 1 (ST?)*	0
<i>B.dolosa</i> (n= 4)	0	4 (ST72)
<i>B.multivorans</i> (n= 2)	2 (ST19)	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.
KF: Kistik fibrozis, MLSA: Multilokus sekans analizi.

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 III).

Klinik izolatların tamamı değerlendirildiğinde; biyofilm yapımı izolatların %53 (n= 20/38)'ünde pozitif saptanmıştır. *Burkholderia* türleri arasında biyofilm yapımı *B. cenocepacia*'da %75 (n= 10/16), *B. contaminans*'da %63 (n= 7/11) ve *B. multivorans*'da tamamında (n= 2/2) tespit edilmiştir. *B. dolosa* ve *B. seminalis* izolatlarının tamamı ve *B. gladioli* izolatlarının %75 (n=3/4)'i biyofilm yapımı açısından negatif bulunmuştur. *Burkholderia* türleri arasında biyofilm yapımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo IV, $p \geq 0.05$). İzolatların biyofilm oluşturma özelliği ile KF ilişkisine bakıldığında, KF'li (%56, 14/25) ve KF'si olmayan (%46, 6/13) hastalardan elde edilen izolatlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p \geq 0.05$, Tablo V).

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 bulunur-

Tablo III. KF ve KF Olmayan Hastalardan İzole Edilen *Burkholderia* Türlerinin MALDI-TOF MS Sonucunun MLSA Sonucu ile Karşılaştırılması

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

* Veri tabanında bulunmamaktadır.

KF: Kistik fibrozis, MLSA: Multilokus sekans analizi.

Tablo IV. *Burkholderia* Türlerinin Biyofilm Oluşumu

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

Tablo V. KF ve KF Olmayan Hastalardan İzole Edilen *Burkholderia* Türlerinin Biyofilm Yapımı

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

KF: Kistik fibrozis.

Tablo VI. *Burkholderia* Türlerinin Antibiyotik Duyarlılıkları

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

TMP-SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, S: Duyarlı, R: Dirençli.

ken, *B.dolosa* izolatlarının tamamı dirençli saptanmıştır. *B.cenocepacia* izolatlarının seftazidim, meropenem, TMP-SMZ 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 anlamlılık göstermemiştir ($p \geq 0.05$, Tablo VI). KF'li ve KF olmayan hastalar arasında izolatların antibiyotik direnci karşılaştırıldığında

seftazidim KF hastalarında daha duyarlı saptanmıştır ($p= 0.010449$), diğer antibiyotikler için KF ve KF olmayan hastalar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p> 0.05$, Tablo VII).

Klinik izolatların iki tanesinde (*B.cenocepacia*, *B.contaminans*) meropenem ve TMP-SMZ arasında sinerji saptanmıştır. Antibiyotiklerin ikili kullanımı ile ortaya çıkabilecek antagonizma 15 klinik izolatta saptanmış, bunların 12 tanesi meropenem ve seftazidim arasında, üç tanesi TMP-SMZ ve seftazidim arasında bulunmuştur. Meropenem ve seftazidim kombinasyonunda antagonizma gösteren isolatlar *B.cenocepacia* (%66, 8/12), *B.contaminans* (%17, 2/12) ve *B.multivorans* (%17, 2/12) olarak saptanmıştır. TMP-SMZ ve seftazidim kombinasyonuna antagonizma ise iki *B.contaminans* ve bir *B.seminalis* izolatında belirlenmiştir. Aynı hastaya ait olan bu *B.contaminans* isolatlarında yıllar içinde seftazidim direnci geliştiği görülmüştür (Tablo VIII).

Çalışmada değerlendirilen tüm klinik izolatların antibiyotik dirençleri biyofilm yapımı ile ilişkisi değerlendirildiğinde meropenem dirençli 25 izolatın 12'sinin, TMP-SMZ dirençli, 19 izolattan dokuzunun biyofilm oluşturduğu saptanmıştır (Tablo IX). İzolatların biyofilm oluşturma özelliği ile antibiyotik direnci ilişkisine bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p\geq 0.05$).

Tablo VII. KF ve KF Olmayan Hastalardan İzole Edilen Burkholderia Türlerinin Antibiyotik Duyarlılıkları

		KF (n= 25)	KF olmayan (n= 13)
Seftazidim	S	20 (%80)	5 (%38)
	R	5 (%20)	8 (%62)
Meropenem	S	10 (%40)	3 (%23)
	R	15 (%60)	10 (%77)
TMP-SMZ	S	15 (%60)	4 (%31)
	R	10 (%40)	9 (%69)
Levofloksasin	S	17 (%68)	6 (%46)
	R	8 (%32)	7 (%54)

TMP-SMZ: Trimetoprim-sülfametoksazol, S: Duyarlı, R: Dirençli, KF: Kistik fibrozis, MLSA: Multilokus sekans analizi.

Tablo VIII. Burkholderia Türlerinin Sinerji Sonuçları

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

TMP-SMZ: Trimetoprim-sülfametoksazol.

Tablo IX. Dirençli *Burkholderia* Türlerinin Biyofilm Oluşumu

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

TMP-SMZ: Trimetoprim-sülfametoksazol.

TARTIŞMA

Mikroorganizmanın tür düzeyinde doğru tanımlanması tedavinin doğru planlanmasında ilk adımdır. *Burkholderia* türlerinin fenotipik özellikleri yüksek düzeyde benzerlik gösterdiği için güncel çalışmalarda geleneksel yöntemlerle hatalı tanımlamaların olduğu vurgulanmakta ve doğru tanımlama için moleküler yöntemler önerilmektedir⁹. Moleküler yöntemlerin büyük kısmında yüksek maliyet ve deneyimli personel ihtiyacı bulunması nedeniyle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın kullanımları mümkün olmamıştır. 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 fenotipik ve moleküler yöntemlerin karşılaştırıldığı çalışmalarda farklı moleküler yöntemler (16S rRNA dizileme, recA geni dizileme) altın standart olarak kullanılmış olsa da, çalışmamızda kullanılan MLSA yönteminde analiz edilen yedi “housekeeping” geninin dizilenmesi, *Burkholderia* türleri için güçlü ve güvenilir tanımlama sağlamaktadır¹⁰.

Literatürde en sık izole edilen *Burkholderia* türleri ile ilgili çalışmalar bölgesel farklılıklar göstermektedir. Agodi ve arkadaşları¹¹ 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 olmuştur¹²⁻¹⁴. İngiltere’de “Cystic Fibrosis Antibiotic Susceptibility Service (CFASS)” tarafından yapılan bir çalışmada ise KF hastalarında en sık *B.multivorans* (%58), ikinci sıklıkta *B.cenocepacia* (%36) bildirilmiştir¹⁵. Literatürde *Burkholderia* türlerinin tanımlanmasında ülkeler arasında farklı sonuçlar elde edilmesi ulusal tedavi planlarının oluşturulmasında bölgesel özelliklerin bilinmesinin önemi ortaya koymaktadır.

Klinik izolatların sekans tiplerinin belirlenerek epidemiyolojik veri sağlaması MLSA yönteminin önemli bir avantajıdır. Çalışmamızda değerlendirilen 38 izolatın en az on farklı sekans tipinde dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Mevcut veri tabanındaki sekans tipleri ile eşleşmeyen iki izolatın yeni sekans tipi olması muhtemeldir. Hastaların hiçbirinde iyi bilinen epidemik suşlar (ST28, ST32 ve ST16) saptanmamıştır. Bu çalışmadaki en geniş sekans tipi

çeşitliliği *B.cenocepacia* izolatlarında görülmüş olup dört farklı sekans tipi (ST602, ST740, ST839 ve ST1392) içermektedir. Bu izolatlar bilinen bir klonal komplekse ait değildir. Değerlendirdiğimiz tüm izolatların sekans tipleri arasında ikinci sıklıkta görülen ST839, Gautam ve arkadaşları¹⁶ tarafından 2017 yılında Hindistan'da yapılan bir çalışmada ilk defa tanımlanmış ve bu çalışmada en sık saptanan üçüncü sekans tipi olarak bildirilmiştir. Bu izolatin farklı coğrafi bölgelerde yüksek sıklıkta tespit edilmesi epidemiyolojik açıdan önemli bir bulgudur. İzolatlarımız arasında bulunan *B.multivorans* ST19 Kanada ve Çek Cumhuriyeti'nde saptanmıştır¹⁷. Değerlendirdiğimiz izolatlar arasında en sık tespit edilen sekans tipi *B.contaminans* ST102 olup, mevcut literatürde bu sekans tipine ait birçok ülkeden bildirilmiş izolatlar bulunmaktadır¹⁸. Bulgularımız bilindiği kadarıyla ülkemizde *Burkholderia* türleri ile ilgili elde edilen ilk sekans tipi sonuçlarıdır. Ayrıca *B.cenocepacia* ST602 ve *B.contaminans* ST102'nin KF ve KF olmayan hastalarda saptanmış olması gelecekte yapılacak virülans çalışmaları ve epidemiyolojik çalışmalara ışık tutacaktır.

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 bildirilmektedir¹⁹. 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 olup elde edilen spektrumun analizi ile uyumlu en yakın türün sonuç olarak değerlendirilmesidir.

B.contaminans ilk olarak 2009 yılında tanımlanmış olup bu tarihten sonra yapılan çalışmalarda daha sık bildirilmeye başlanmıştır. Arjantin'de yapılan bir çalışmada *B.contaminans* olguların %57'sinde saptanmış ve en sık görülen tür olarak bildirilmiştir²⁰. İspanya'daki bir çalışmada, daha önce sık izole edilen *B.multivorans* ve *B.cenocepacia*'nın yerini *B.contaminans*'ın aldığı bildirilmiştir²¹. Bizim çalışmamızın MLSA sonuçlarına göre *B.contaminans* (%29) ikinci en sık görülen tür olarak saptanmıştır. Bu bakterinin rutinde kullanılan tüm otomatize sistemlerin veri tabanında henüz bulunmuyor olması nedeniyle, tanımlama sırasında benzer özelliklere sahip olan türlerin tanımlandığı düşünülmektedir.

Burkholderia türleri ile geçici enfeksiyonlar da görülebilmektedir. *B.multivorans*'la enfekte hastaların %47'sinde, *B.cenocepacia* ile enfekte hastaların %1'inde geçici enfeksiyon olduğu bildirilmiştir²². Başka bir çalışmada ise 70 olgunun sekiz tanesinin (%11) *B.stabilis* olduğu ve bunların tamamının geçici enfeksiyon olduğu bildirilmiştir²³. Çalışmamızda *B.multivorans* klinik izolatların %5'inde saptanmıştır. Bu izolatlar aynı KF hastasının farklı yıllardaki örneklerinden izole edilmiş, aynı sekans tipine sahip izolatlardır ve kalıcı enfeksiyon olarak değerlendirilmiştir.

Biyofilm oluşturan bakterilerle gelişen enfeksiyonlarda doğru antibiyotik seçimi 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 persistant olmaya yatkın olduğu vurgulanmıştır²⁴. *Burkholderia* türleri ile yapılan benzer çalışmalarda, Peeters ve arkadaşları²⁵ tarafından planktonik ve biyofilm oluşturan izolatların antibiyotik duyarlılıkları arasında anlamlı fark olmadığı bildirilirken, VanAcker ve arkadaşları²⁶ planktonik hücrelere etkili dozda tobramisin uygulaması durumunda biyofilm içinde fazla miktarda persistant bakteri kaldığını göstermişlerdir. Dales ve arkadaşları²⁷ tarafından yapılan bir çalışmada ise biyofilm oluşturan türlerin daha dirençli olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada yüksek doz tobramisin ve meropenem ilave olarak piperasilin tazobaktam, trimetoprim sülfametoksazol, amikasin veya seftazidimden birini içeren üçlü tedavi kombinasyonlarının kullanılması önerilmiştir. Bizim çalışmamızda biyofilm oluşturan ve oluşturmayan izolatların antibiyotik dirençleri de birbirine benzer saptanmıştır. Ancak çalışmamızda değerlendirilen izolat sayısının az olması nedeni ile sonuçların farklı çıkabileceği düşünülmektedir.

Tüm izolatların seftazidim, meropenem, TMP-SMZ ve levofloksasin antibiyotiklerine dirençleri değerlendirildiğinde sırasıyla %34, %66, %50 ve %40 olarak saptanmış, türler arasında antibiyotik direnci açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. KF'li hastalardan elde edilen izolatların KF olmayan hastalardan izole edilenlere göre seftazidim açısından daha duyarlı bulunmasına rağmen test edilen diğer antibiyotikler için benzer duyarlılık profiline sahip olduğu görülmüştür. Lupo ve arkadaşları²⁸ tarafından yapılan çalışmada *B.cenocepacia* izolatlarının seftazidim duyarlılığının (%93), tüm test edilen izolatların seftazidim duyarlılığı (%86) ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı olduğu ve *B.multivorans* izolatlarının test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu bulunmuştur. Literatürdeki bazı araştırmalarda *Burkholderia* türlerinde meropenem duyarlılığı yüksek bulunmuş²⁹, ancak bizim çalışmamızda en fazla direnç meropenemde gözlenmiştir. Bu sonuçlar tedavi alternatiflerinin belirlenmesinde bölgesel verilerin bilinmesi ve bu doğrultuda antibiyotik seçilmesinin önemini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar tedavi alternatiflerinin belirlenmesinde bölgesel verilerin bilinmesi ve bu doğrultuda antibiyotik seçilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Klinik izolatların iki tanesinde (%5) meropenem ve TMP-SMZ arasında sinerji saptanmıştır. *Burkholderia* türlerinin tedavisinde birinci basamak seçilen ilaç TMP-SMZ olup genellikle bir beta-laktam ile kombine edilmektedir. Tedavide kullanılan antibiyotiklerin kombinasyonlarını değerlendiren literatürdeki en kapsamlı çalışmalardan biri olan Zhou ve arkadaşları³⁰ tarafından yapılan çalışmada, %4 meropenem ve TMP-SMZ sinerjisi saptanmıştır. Bu bulgu bizim çalışmamız ile benzer bulunmuştur. Antibiyotiklerin in vitro kombinasyonlarının değerlendirilmesi ile 15 klinik izolatta antagonizma saptanmış, bunların 12'sinin meropenem ve seftazidim arasında olduğu belirlenmiştir. Gram-negatif bakterilerde beta-laktamlara direnç gelişmesinde en önemli mekanizma beta-laktamaz

oluşturmalarıdır. *Burkholderia* türlerinde sınıf A beta-laktamazlar olan PenA ve PenI, karbapenemler ve beta-laktamaz inhibitörlerini içeren çok geniş bir substrat profiline sahiptir. Bu çalışmada; 12 izolatta görülen meropenem-seftazidim antagonizmasının güçlü bir beta-laktamaz indükleyicisi olan meropenem tarafından indüklenen beta-laktamazların ekspresyonuna bağlanabilir.

Bu çalışmada KF ve KF olmayan hastalardan izole edilen *Burkholderia* türlerinin tür düzeyinde dağılımı, tür düzeyinde tanımlamada güvenilir analiz yöntemi, biyofilm oluşumu, in vitro antibiyotik ve kombine antibiyotiklere duyarlılıkları değerlendirilerek bölgesel düzeyde önemli veriler elde edilmiştir. Çalışmada KF ve KF olmayan hastalardan izole edilen türler arasında antibiyotik direncinde ve biyofilm yapımında anlamlı bir fark tespit edilmemiş olmasına rağmen çalışılan izolat sayısının sınırlı olması nedeni ile daha büyük ölçekli bir çalışma gerekli olduğu kanısındayız.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Bach E, Sant'Anna FH, Magrich Dos Passos JF, Balsanelli E, de Baura VA, Pedrosa FO, et al. 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;75(6).
2. Drevinek P, Mahenthiralingam E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. Clin Microbiol Infect 2010;16(7):821-30.
3. Spilker T, Baldwin A, Bumford A, Dowson CG, Mahenthiralingam E, LiPuma J. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. J Clin Microbiol 2009;47(8):2607-10.
4. 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(3):213-6.
5. Scoffone V, Chiarelli LR, Trespidei G, Mentasti M, Riccardi G, Buroni S. *Burkholderia cenocepacia* infections in cystic fibrosis patients: drug resistance and therapeutic approaches. Front Microbiol 2017;8:1592.
6. Maiden MC. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci 1998;95:31405.
7. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. J Vis Exp 2011;(47):2437.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-seventh informational supplement. M100-S27, 2017. CLSI, Wayne, Pennsylvania.
9. Coenye T, Vandamme P, Govan J, LiPuma J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol 2001;39(10):3427-36.
10. Vandamme P, Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: past, present and future. Syst Appl Microbiol 2011;34(2):87-95.
11. 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(8):2891-6.
12. Cunha MV, Pinto-de-Oliveira A, Meirinhos-Soares L, Salgado MJ, Melo-Cristino J, Correia S, et al. Exceptionally high representation of *Burkholderia cepacia* among *B.cepacia* complex isolates recovered from the major Portuguese cystic fibrosis center. J Clin Microbiol 2007;45(5):1628-33.

13. Norkov-Lauritsen N, Johansen HK, Fenger MG, Nielsen XC, Pressler T, Olesen HV, et al. Unusual distribution of *Burkholderia cepacia* complex species in Danish cystic fibrosis clinics may stem from restricted transmission between patients. J Clin Microbiol 2010;48(8):2981-3.
14. 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(Pt 7):603-4.
15. Jones AM, Dodd ME, Govan JR, Barcus V, Doherty CJ, Morris J, et al. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. Thorax 2004;59(11):948-51.
16. Gautam V, Patil PP, Kumar S, Midha S, Kaur M, Kaur S, et al. Multilocus sequence analysis reveals high genetic diversity in clinical isolates of *Burkholderia cepacia* complex from India. Sci Rep 2016;6:35769.
17. Baldwin A, Mahenthiralingam E, Drevinek P, Pope C, Waine DJ, Henry DA, et al. Elucidating global epidemiology of *Burkholderia multivorans* in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 2008;46(1):290-5.
18. Voronina OL, Kunda MS, Ryzhova NN, Aksenova EI, Semenov AN, Romanova YM, et al. *Burkholderia contaminans* biofilm regulating operon and its distribution in bacterial genomes. Biomed Res Int 2016;2016: 6560534.
19. Fehlberg LC, Andrade LH, Assis DM, Pereira RH, Gales AC, Marques EA. Performance of MALDI-ToF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 2013;77(2):126-8.
20. Martina P, Bettiol M, Vescina C. Genetic diversity of *Burkholderia contaminans* isolates from cystic fibrosis patients in Argentina. J Clin Microbiol 2013;51(1):339-44.
21. 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(2):150-6.
22. Fila L, Drevinek P. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis in the post-epidemic period: multilocus sequence typing-based approach. Folia Microbiol (Praha) 2017;62(6):509-14.
23. 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 2004;42(4):1491-7.
24. Wang YC, Huang TW, Yang YS, Kuo SC, Chen CT, Liu CP, et al. Biofilm formation is not associated with worse outcome in *Acinetobacter baumannii* bacteraemic pneumonia. Sci Rep 2018;8(1):7289.
25. 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.
26. Van Acker H, Sass A, Bazzini S, De Roy K, Udine C, Messiaen T, et al. Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species. PLoS One 2013;8(3):e58943.
27. Dales L, Ferris W, Vandemheen K, Aaron SD. 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(10):1275-9.
28. 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(2):281-8.
29. Nzula S, Vandamme P, Govan JR. Influence of taxonomic status on the in vitro antimicrobial susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. J Antimicrob Chemother 2002;50(2):265-9.
30. 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(3):1085-8.