

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

KATYONİK STEROİD ANTİBİYOTİKLERİN
BURKHOLDERIA CEPACIA KOMPLEKS SUŞLARINA
KARŞI OLUŞTURDUĞU İN VİTRO ETKİLERİN
ARAŞTIRILMASI

ELİF SENA DEMİR

DANIŞMAN
DOÇ.DR.ÇAĞLA BOZKURT GÜZEL

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

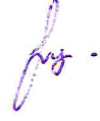
İSTANBUL-2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Elif Sena Demir



İTHAF

Her zaman bana sonsuz destekleri olan Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimin son yılında ve yüksek lisans eğitimim boyunca, tezimin hazırlanması pandemi dönemine denk gelmesine rağmen hiçbir konuda yardımını esirgemeyen, her aşamasında büyük bir titizlikle yardımcı ve destek olan, bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Çağla Bozkurt-Güzel'e,

Yüksek lisans eğitimine başladığım günden itibaren sürekli yanımda olan en yoğun zamanlarında dahi her konuda yakın ilgi, destek ve anlayışını gördüğüm, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen en değerli hocalarım Prof. Dr. Berna Özbek-Çelik, Prof.Dr. A. Seher Birteksöz-Tan, Doç.Dr. Sibel Döşler, Dr.Öğr.Üyesi Emel Mataracı-Kara, Dr.Öğr.Üyesi Mayram Hacıoğlu ve Kimyager Emine Tuncer'e,

Bu çalışmadaki bakterileri temin etmemizde bize yardımcı olan Uzm. Dr. Havva Özlem Altay' a,

Herhangi bir problem ile karşılaştığımda onu çözmeye yardımcı olan ve desteklerini gördüğüm, laboratuvarıda birlikte çalışma fırsatı bulduğum Özlem Oyardı, Fatmanur Yılmaz, Gizem Akçay ve Zeynep Özgen Özdemir'e

Yüksek lisans eğitimim boyunca yarı-zamanlı çalıştığım ve her türlü desteğini gördüğüm ve belki de bana kendimden daha çok inanan başta Aysun Vanlı, Esra Yalçınıl, Seda Acun Başdaş, Selin Çataltepe ve tüm kalite operasyonları ve kalite uyum ekibine,

Her konuda yardım ve desteklerini gördüğüm her zaman yanımda olan tüm arkadaşlarıma,

Tüm yaşamım boyunca her zaman yanımda olan ve beni her zaman destekleyen canım ailem Makbule Demir, Mehmet Demir ve Esra Sare Demir'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34992

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Burkholderia cepacia</i> Kompleks Genel Özellikleri.....	3
2.2. Epidemiyoloji.....	3
2.3. Taksonomi.....	4
2.3.1. Temel Taksonomi	4
2.3.2. Moleküler Filojeni.....	6
2.3.3. Moleküler Yöntemler	7
2.3.3.1. <i>hisA</i> ve <i>rpsU</i> gen sekansı.....	7
2.3.3.2. <i>recA</i> Gen Sekanslaması ve 16s rRNA Sekansı.....	7
2.4. Tüm Genom Sekanslama	7
2.5. Multilokus Sekans Analizi	7
2.6. <i>Burkholderia</i> Türlerinde Antibiyotik Direnci	10
2.6.1. Bcc türlerinde β -Laktam Direnci	11
2.6.2. Bcc türlerinde Atım Pompası	12
2.6.3. Bcc türlerinde Dış Membran Geçirgenlik Bariyeri	13
2.6.4. Bcc türlerinde İlaç Hedeflerinin Değiştirilmesi	14
2.7. Bcc'nin Tedavisi	15
2.7.1. Monoterapi	15
2.7.2. Kombinasyon Tedavisi	16
2.7.3. Yeni Tedaviler.....	16

2.8. Cerageninler (Katyonik Steroid Antibiyotikler- CSA).....	16
2.8.1. Cerageninlerin Hücre Duvarına Etki Mekanizmaları	17
2.8.2. Cerageninlerin Antibakteriyel Aktivitesi	19
2.8.3. Cerageninlerin Bakteriyel Hücre Duvarına Karşı Etkisi ve Bakterisidal Aktivite	20
2.9. Cerageninler ve Pluronik Miselleri	21
2.10. Cerageninlerin Antibiyotiklerle Kombinasyonu	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Bakteri İzolatları	22
3.2. Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler ve Çözeltiler	22
3.3. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	23
3.3.1. Triptik Soy Agar (TSA)	23
3.3.2. Katyon İlaveli Mueller Hinton Bunyon (KİMHB)	23
3.3.3. Bakterilerin Saklanması için Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	23
3.3.4. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması	24
3.4. Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi	24
3.5. Minimum Bakterisidal Konsantrasyonlarının (MBK) Değerlerinin Belirlenmesi ..	25
3.6. Antimikrobiyallerin “Zamana-bağlı Öldürme” Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitelerinin Saptanması.....	25
3.6.1. Antimikrobiyal Maddelerin Tek Başına Bakterisidal Etkilerinin Saptanması..	25
3.6.2. Antimikrobiyal Maddelerin Kombinasyon Halinde Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması	26
3.7. İstatiksel Analiz	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. MİK Değerlerine Ait Bulgular	28
4.1.1. Deney Koşullarının Standardizasyonuna Ait Bulgular	28
4.1.2. Klinik Örneklerden İzole Edilmiş Bcc Suşlarına Ait Bulgular	28
4.2. MBK Değerlerine Ait Bulgular	30
4.3. Antimikrobiyal Maddelerin “Zamana-bağlı Öldürme” Eğrilerine ait Bulgular	30
4.3.1. Antimikrobiyal Maddelerin Tek Başlarına Oluşturduğu Bakterisidal Etkilere Ait Bulgular.....	30
4.3.2. Antimikrobiyal Maddelerin Kombinasyon Halinde Etkilerinin Zamana-Bağlı Öldürme Eğrilerine Ait Bulgular	31

4.4. İstatiksel Analize Ait Bulgular.....	37
5. TARTIŞMA	39
KAYNAKLAR	46
ETİK KURUL KARARI	55
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	56
ÖZGEÇMİŞ	57



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: <i>Burkholderia cepacia</i> kompleks sınıflandırılması	8
Tablo 4-1: Antimikrobiyal maddelerin 42 adet Bcc suşuna karşı saptanan MİK aralığı, MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri (µg/ml).....	29
Tablo 4-2: Zamana- bağlı öldürme deneylerinde kullanılan 5 adet Bcc suşunun MİK değerleri (µg/ml)	29
Tablo 4-3: CLSI kılavuzuna göre antimikrobiyal maddelerin duyarlılık sınırları	29
Tablo 4-4: 42 adet Bcc suşunun antibiyotik duyarlılığı.....	30
Tablo 4-5: Antimikrobiyal maddelerin 42 Bcc suşuna karşı saptanan MBK aralığı, MBK ₅₀ ve MBK ₉₀ değerleri (µg/ml).....	30
Tablo 4-6: Antimikrobiyal maddelerin tek başına oluşturduğu etkilere ait ortalama bulgular	31
Tablo 4-7: Antimikrobiyal maddelerin kombinasyon halinde oluşturduğu etkilere ait ortalama bulgular	32

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: 116 Bcc genomunun yeniden sınıflandırılması ile muhtemel maksimum filogenetik ağaç.....	9
Şekil 2-2: Katelisidin LL-37 ve Magainin I' nın yüzeyel amfilitesini gösteren sarmal teker gösterimi	18
Şekil 2-3: Kolik asit ve CSA-8, CSA-13 ve CSA-54'ün kimyasal yapıları	19
Şekil 2-4: Ceragenin CSA-131'in yapısı	20
Şekil 4-1: Antimikrobiyal maddelerin A) MİK ve B) 4xMİK'de tek başlarına ve kombinasyon halinde B1 suşuna karşı elde edilen zamana-bağlı öldürme eğrilerine ait bulgular	34
Şekil 4-2: Antimikrobiyal maddelerin A) MİK ve B) 4xMİK'de tek başlarına ve kombinasyon halinde B2 suşuna karşı elde edilen zamana-bağlı öldürme eğrilerine ait bulgular	35
Şekil 4-3: Antimikrobiyal maddelerin A) MİK ve B) 4xMİK'de tek başlarına ve kombinasyon halinde B3 suşuna karşı elde edilen zamana-bağlı öldürme eğrilerine ait bulgular	36
Şekil 4-4: Antimikrobiyal maddelerin A) MİK ve B) 4xMİK'de tek başlarına ve kombinasyon halinde B4 suşuna karşı elde edilen zamana-bağlı öldürme eğrilerine ait bulgular	37
Şekil 4-5: Antimikrobiyal maddelerin A) MİK ve B) 4xMİK'de tek başlarına ve kombinasyon halinde B5 suşuna karşı elde edilen zamana-bağlı öldürme eğrilerine ait bulgular	38

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Bcc: *Burkholderia cepacia* kompleks

KF: Kistik fibrozis

CSA: Cationic Steroid Antibiotics, Katyonik Steroit Antibiyotikler

SXT: Trimetoprim- Sülfametoksazol

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MBK: Minimum Bakterisit Konsantrasyon

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü

AMP: Antimikrobiyal Peptit

CDC: Centers for Disease Control and Prevention, Amerikan Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi

MLSA: Multi Lokus Sekans Analizi

MLST: Multi Lokus Sekans Tiplendirmesi

IDSA: Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği

WHO: World Health Organization, Dünya Sağlık Örgütü

LPS: Lipopolisakkarit

Pluronik: Poloksamer Pluronic® F127

TSA: Triptik Soy Agar

MHB: Mueller Hinton Buyyon

Ca⁺²: Kalsiyum

Mg⁺²: Magnezyum

TSB: Triptik Soy Buyyonu

KİMBH: Katyon İlaveli Mueller Hinton Buyyonu

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Ulusal Klinik Laboratuvar Standardı Komitesi

ÖZET

Demir ES. Katyonik steroid antibiyotiklerin *Burkholderia cepacia* kompleks suşlarına karşı oluşturduğu in vitro etkilerin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2020.

Burkholderia cepacia kompleks (Bcc) türleri aerop, Gram negatif ve non-fermantatif çomaklardır. Bcc, kistik fibrozis (KF) hastalarında asemptomatik taşıyıcılıktan ölümcül pnömoniye kadar değişen klinik tablolara neden olabilmektedir. Bu bakteri kompleksinin birçok antibiyotiğe doğal dirençli olması, hastane ortamında bulaşma olasılığının yüksek olması erken tanı ve tedavinin önemini arttırmaktadır. Tedavi edilmesi güç enfeksiyonlar alternatif antimikrobiyal madde gereksinimini ortaya çıkarmıştır. Bu alternatif maddelerden biri antimikrobiyal peptitlerin benzeri ve bakteri hücre duvarına etkili olan cerageninlerdir (katyonik steroid antibiyotikler-CSA). Çalışmamızda, çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 42 adet Bcc suşuna karşı CSA-13, CSA-131 ve CSA-131-P'nin ve levofloksasin ve trimetoprim- sülfametoksazol (SXT)' ü tek başına ve kombinasyon halinde in vitro etkileri araştırılmıştır. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi, kombinasyon halindeki antimikrobiyal etkileri ise zamana-bağlı öldürme yöntemi ile belirlenmiştir. MİK₅₀ (µg/ml) değerleri, CSA-13, CSA-131, CSA-131-P, levofloksasin ve SXT için sırasıyla 16, 16, 16, 2 ve 1/19'dir. MBK değerleri, MİK değerlerinin iki katı olarak saptanmıştır. Zamana-bağlı öldürme deneylerine göre CSA-13 ve ilk altı saatte CSA-131-P bakterisidal etki göstermektedir. CSA-13'ün levofloksasin ve SXT ile kombinasyonlarında sadece 4xMİK'de değil aynı zamanda 1xMİK'de de sinerjistik etki gözlenmiştir. Ayrıca, CSA-131 levofloksasin ile kombinasyon halinde kullanıldığında, sinerjistik etki saptanmıştır. Antagonist etki gözlenmemiştir. Sonuç olarak; CSA'ların, özellikle CSA-13 ve CSA-131' in, tek başına ya da kombinasyon halinde kullanımlarının Bcc enfeksiyonlarının tedavisinde iyi birer aday olacağı düşüncesindeyiz. Ancak, CSA'ların stabilite özellikleri, etkinlikleri ve farmakokinetik özelliklerindeki eksiklikler, gelecekte bu konuda daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Burkholderia cepacia* kompleks, katyonik steroid antibiyotikler, minimum inhibitör konsantrasyon, in vitro kombinasyon, zamana-bağlı öldürme yöntemi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34992

ABSTRACT

Demir ES. Investigation of in vitro effects of cationic steroid antibiotics against *Burkholderia cepacia* complex strains. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceuticals Microbiology. Master Thesis. İstanbul. 2020.

Burkholderia cepacia complex (Bcc) species are aerobic, Gram negative and non-fermentative bacillus. Bcc can cause asymptomatic carriage to fatal pneumonia patients with cystic fibrosis. This bacterial complex is intrinsically resistant to antibiotics and the possibility of transmission from hospital, increases the importance of diagnosis and treatment. Infections that are difficult to treat revealed the need for alternative antimicrobial agents. One of these alternative substances is ceragenins which are similar to antimicrobial peptides and act on bacterial wall. In our study, in vitro effects of CSA-13, CSA-131, CSA-131-P, levofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) alone and combination against 42 Bcc strains isolated from clinical samples were investigated. MIC and MBC values were determined by broth microdilution method and combination antimicrobial effects by time-kill method. MIC₅₀ (µg/ml) values for CSA-13, CSA-131, CSA-131-P, levofloxacin and SXT were 16, 16, 16, 2 and 1/19, respectively. MBC values of ceragenins were determined as twice the MIC values. According to the time-kill experiments, CSA-13 and CSA-131-P showed bactericidal effect in the first six hours. In the combinations of CSA-13 with levofloxacin and SXT, synergistic effect was observed not only in 4xMIC but also in 1xMIC. In addition, when CSA-131 was used in combination with levofloxacin, synergistic effect was detected. Antagonistic effect was not observed. As a result, we think that the use of CSAs, especially CSA-13 and CSA-131, alone or combination will be good candidates for the treatment of Bcc infections. However, deficiencies in the stability properties, efficacy and pharmacokinetics of CSAs require further research in the future.

Key Words: *Burkholderia cepacia* complex, cationic steroid antibiotics, minimum inhibitory concentration, in vitro combination, time kill curve method

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: 34992

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Burkholderia cepacia kompleksi (Bcc), birbirleriyle yakından ilişkili en az 23 fırsatçı patojen içeren bir Gram negatif bakteri grubudur (1). İmmünsüprese ve kistik fibrozis (KF) hastalarında genellikle akciğer fonksiyonlarında azalmaya bağlı olarak morbidite ve mortalitede artışa neden olur. Bu enfeksiyonun epidemiyolojisi değişkenlik göstermekle birlikte, doğal antibiyotik direnci nedeniyle tedavi edilmesi zordur. Bcc'de non-fermantatif Gram negatif bakterilere kıyasla daha geniş bir antibiyotik direnci bulunmaktadır. Penisilinler, sefalosporinler (seftazidim hariç), monobaktamlar, karbapenemler (meropenem hariç), polimiksinler, aminoglikozitler ve fosfomisine doğal olarak dirençlidirler. Doğal direnç diğer birçok antimikrobiyal sınıfın etkisini önlediğinden, Bcc enfeksiyonlarının tedavisi, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından standardize edilen yöntemlerle belirlediği antibiyotiklerin (SXT, tikarsilin- klavunat, seftazidim, minosiklin, levofloksasin ve kloramfenikol) duyarlılık kriterlerine göre uygulanmaktadır (2).

Dirençli Bcc suşlarıyla enfekte olan hastalarda gelişen tedavisi güç enfeksiyonlar araştırmacıları alternatif antimikrobiyal maddelerin arayışına yöneltmiştir. Yeni antibiyotik ajanlardan biri olan cerageninler (katyonik steroid antibiyotikler- CSA) antimikrobiyal peptitlerin (AMP) benzerleridir. Cerageninler seçici olarak bakteriyel zarları hedeflemektedir (3) ve cerageninlerin bakterilerin sitoplazmik membranları ile birleşmesi hücre ölümüne neden olmaktadır. Cerageninler, Gram negatif bakterilerin dış zarlarını geçebilmektedir ve sitoplazmik membran depolarizasyonu sağlayarak bakterisidal aktivite göstermektedir. Böylece membran defektlerinin oluşumuna neden olarak bakteriyel ölüme yol açar. Cerageninler, Gram negatif bakteriler başta olmak üzere birçok dirençli bakterilere karşı etkilidir. Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar için tedavi seçenekleri, Gram pozitif bakterilerle karşılaştırıldığında, Gram negatif bakterilerin dış zarları tarafından sağlanan geçirgenlik bariyeri ve dışa atım pompaları nedeniyle sınırlıdır ve cerageninler ilaca dirençli Gram negatif bakterilere karşı aktiviteyi korurlar (4).

Bcc enfeksiyonlarını önlemek ve tedavi etmek amacıyla tedavide monoterapiden yararlanılabileceği gibi antimikrobiyal maddelerin kombinasyon halinde oluşturdukları olumlu etkilerden (sinerjist veya aditif) de yararlanılabilir. Cerageninler, Gram negatif

bakterilerin hücre duvarlarını etkileyerek birlikte kullanıldığı antimikrobiyal ajanın sitoplazmik zara etki etmesini kolaylaştırır (5). Böylece mikroorganizmalara karşı etki spektrumu genişletilir, bakterisidal etki artırılır, direnç gelişiminin önüne geçilir ve daha düşük dozda uygulama sonucu daha az yan etki ortaya çıkmaktadır (6).

Antibiyotik kombinasyonlarının etkinliklerinin test edilmesinde kullanılan standart yöntemlerden biri olan zamana-bağılı öldürme deneyi tek başına ve/ya kombinasyon halinde kullanılan antimikrobiyal maddelerin mikroorganizmalar ile zaman içindeki etkileşimlerini ve bakterisidal tedavinin gerekli olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antimikrobiyallerin bakterisidal özelliklerini tespit edebileceğimiz bir yöntemdir (2).

Daha önce yapılan çalışmalarda, CSA'ların Bcc'ye karşı in vitro antimikrobiyal etkinliğinin incelendiği çalışma olmamasından dolayı, bu çalışmamızın önemli bir özelliği de, cerageninlerin Bcc'ye karşı in vitro antimikrobiyal etkinliğin incelendiği ilk çalışma olmasıdır.

Çalışmamızda, henüz klinik kullanıma girmemiş olan katyonik steroid moleküllerden CSA-13, CSA-131'in ve CSA-131-P'nin kliniklerde Bcc enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan bazı antibiyotiklerin tek başına ve kombinasyon halinde oluşturdukları çeşitli in vitro etkilerin (MİK, MBK), Bcc suşlarına karşı "sıvı mikrodilüsyon" ve "time-kill curve" yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Burkholderia cepacia* Kompleks Genel Özellikleri

Burkholderia cepacia kompleks (Bcc) türleri glukozu fermente etmeyen, aerop, hareketli, Gram negatif çomaklardır. Kompleks en az 23 farklı tür içerir ve 1,6- 3,2 µm uzunluğundadırlar. Katalaz reaksiyonu pozitif, oksidaz reaksiyonu türlere göre değişmekle birlikte genellikle zayıf pozitifdir (1). Bu türler tek karbon kaynağı olarak glikoz, gliserol, inositol, galaktoz, sorbitol ve mannitolü kullanabilir. Diğer önemli özellikleri arasında nitrat redüksiyonunun ve lizin dekarboksilaz aktivitesinin pozitifliği ve arjinin dehidrolaz aktivitesinin negatif olması vardır. *B. cepacia*, oksidaz ve lizin dekarboksilaz pozitifdir ve glukozdan asit üretir (7).

2.2. Epidemiyoloji

Bcc genellikle aylarca canlı kalabileceği su, toprak ve nemli ortamlardan izole edilebilir. Ayrıca kistik fibrozis(KF)'li hastaların balgamlarından izole edilebilir ve bu hastaların azalmış solunum fonksiyonlarından dolayı tedavide kullanılan antimikrobiyallere direnç gelişerek mortalitede artışa neden olur. Özellikle KF'li hastalarda kişiden kişiye direkt temasla veya damlacık yoluyla indirekt temasla yatay olarak bulaşma olabilir. Bcc, fagositleri reaktif oksijen türlerini üretemeyen kronik granülatöz hastalığı olan hastalarda da ölümcül enfeksiyonlara neden olabilir (8).

1984 yılında *B. cepacia* kolonizasyonu, enfeksiyonu ve klinik öneminden bahseden ilk detaylı çalışma yayınlanmıştır. Isles ve ark. (9) çoğu zaman, ateş ve solunum yetmezliği ile birlikte pnömoni enfeksiyonu olan, bazen septisemi ile birlikte seyreden vakaları, nekrotizan pnömoni vakalarını “*cepacia* sendromu” olarak tanımlanmıştır. Bazı merkezlerde yeni vakaların kümelenmesi ve diğer merkezlerde kolonize ve kolonize olmamış hastaların ayrılmasının ardından yeni hastaların kolonizasyonunun azalması *B. cepacia* 'nın KF hastaları arasında bulaşabileceğini göstermiştir. Duyarlı kişilerde kişiden kişiye temasın yanı sıra kontamine yüzeyle temasla ve çevrede *B. cepacia*'ya maruz kalınmasıyla da yayılabilir (10).

Bu birbirleriyle yakından ilişkili bakteriler çevrede yaygın olarak bulunurlar ve sağlıklı insanlarda enfeksiyonlara neden olmazlar. 1980' lerde artan Bcc ile enfekte KF hastalarının görülme sıklığı günümüzde, İngiltere'de yaklaşık % 5 ve ABD'de sadece % 2.5 ile nispeten sabit kalmıştır (11,12). Bcc sulu ortamlarda üreyebilir, koruyuculara karşı

direnç gösterebilir ve sıvı ilaçların veya diğer sıvı ürünlerin kontaminasyonuna neden olabilir. Bu Bcc'nin sağlık hizmeti ile ilişkili salgınlara yol açmasına neden olmaktadır. Yıllar boyunca kontamine ilaç ve tıbbi ürün ve ekipmanlardan buluşan Bcc salgınları tanımlanmıştır: Örneğin, 23 Eylül 2016'da Amerikan Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention-CDC), bir rehabilitasyon tesisini *B. cepacia* kan dolaşımı enfeksiyonuna karşı uyarmıştır. Enfeksiyonlar santral venöz kataterler yoluyla intravenöz (IV) sıvılar ve/veya antibiyotik alan kişiler arasında belirlenmiştir. Kontaminasyonun önceden tuzlu su ile doldurulmuş şırıngalardan kaynaklandığı tespit edilmiştir (13). Yine 2016'da Amerika Birleşik Devleti'nde birçok eyalette oral likit dokusat sodyum kullanıma bağlı olarak *B. cepacia* salgını görülmüştür (14). Ülkemizde de 2009 yılında, Koruk ve ark. (15) katater takılması için kullanılan sistoskopi aletinden kaynaklı Bcc enfeksiyonu bildirilmişlerdir.

Salgınlarına ve kontaminasyon potansiyellerine ek olarak, bu mikroorganizmalar biyolojik çevre ve tarım uygulamalarında da önemli bir yere sahipti; su rezervuarları, gıda tedariği ve ev bitkileri dahil olmak üzere kullanıldığı alanlarda direnç gelişimlerinin yarattığı endişe nedeniyle artık kullanılmamaktadır (16). Bu, klorheksidin toleransına ek olarak, Bcc'yi az bilinen potansiyel bir halk sağlığı tehdidi haline getirmiştir.

2.3. Taksonomi

Bcc içindeki türlerin fenotipik olarak çok benzer olması nedeniyle, biyokimyasal test paneli, ticari bakteriyel tanımlama kit ve sistemleri ile kompleks içindeki türlerin güvenli bir şekilde ayrımı yapılamamaktadır. Ayrıca bu türlerin *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Comamonas* ve *Delftia* türleri gibi diğer ilgili taksonlardan güvenilir bir şekilde ayırt edilmesi zordur (17). Salgın araştırmalarında ve epidemiyolojik eğilimlerin tanımlanmasında genom dizilimi esastır (8).

2.3.1. Temel Taksonomi

Walter H. Burkholder, 1940'ların ortalarında soğan köklerindeki çürümenin fitopatojenik bir bakterinin neden olduğunu tanımlamış ve bu türleri soğan anlamına gelen Latince "cepacia" olarak adlandırmıştır (18). Bu tür başlarda *Pseudomonas cepacia* olarak bilinmiştir. Yabucchi ve ark. (19) tarafından 1992'de *Pseudomonas cepacia* türü Betaproteobacteria sınıfında Burkholderiales takımıyla ve *Burkholderiaceae* ailesi ile Burkholder'in çalışmalarına ithafen *Burkholderia cepacia* olarak yeniden adlandırmıştır. *Burkholderia* önceleri rRNA grup II psödomonadlarını (*Pseudomonas glaidoli*,

Pseudomonas mallei, *Pseudomonas pseudomallei* ve *Pseudomonas caryophylli*) içeriyordu (17). İnsan ve hayvan patojenleri olan *B. mallei* ve *B. pseudomallei* hariç *Burkholderia* türleri bitki patojenleri ve toprak bakterileri olarak biliniyordu.

1990'dan bu yana, farklı ekolojik çevrelerden izole edilen *B. cepacia* suşlarının heterojenitesi kayıt edilmiştir. Bu durum kullanılan tekniklerin hassaslığının ve spesifik olup olmadıklarının yeniden değerlendirilmesi gerektiğini göstermiştir ve *B. cepacia* izolatlarının doğru tanımlanması sorunlarına neden olmuştur (20).

Vandamme ve ark. (20) polifazik taksonomik yaklaşımla KF'li hastaların örneklerinden ve çevreden alınan izolatlarla yaptıkları çalışmalarda 5 genomvar kompleksinin olduğunu belirtmişlerdir. Bu polifazik çalışmalarda tüm hücre protein elektroforezi, tüm hücre yağ asidi metil esteraz, DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyon teknikleri kullanılmıştır. Başlarda, *B. cepacia*'nın fenotipik olarak birbirine benzer ve genomik olarak yakın ilişkili en az 5 türün toplamı *Burkholderia cepacia* kompleks olarak biliniyordu. Bu genomik olarak yakından ilişkili türler genomvar olarak bilinir. *B. cepacia* genomvar I-V ve bu genomvar topluluğu Bcc'ini oluşturur. Daha sonraları yapılan taksanomik çalışmalar ile komplekse ait 4 genomvar üyesi eklenmiştir (21). Bu genomvar olarak bilinen türlerin 9'u sırasıyla şu şekildedir: *Burkholderia cepacia* (genomvar I), *Burkholderia multivorans* (genomvar II), *Burkholderia cenocepacia* (genomvar III), *Burkholderia stabilis* (genomvar IV), *Burkholderia vietnamiensis* (genomvar V), *Burkholderia dolosa* (genomvar VI), *Burkholderia ambifaria* (genomvar VII), *Burkholderia anthina* (genomvar VIII), *Burkholderia pyrrocinia* (genomvar IX) (8,21).

Tüm hücre protein elektroforezine dayalı tanımlama sonuçlarının diğer yaklaşımların sonuçları ile daha sonra karşılaştırılması, bazı farklılıklar ortaya koymuştur ve birkaç Bcc türü arasında zayıf ayırım kaydedilmiştir. Bu kompleks şimdi Tablo 2-1'de gösterilen 23 valide edilmiş tür içerir (22-25). Tüm hücre protein elektroforezi, Bcc izolatlarının rutin tanımlanması için artık kullanılmamasına rağmen yakın zamana kadar ilk basamak tarama yöntemi olarak kullanılmıştır.

Hücresel yağ asidi metil ester analizi *Burkholderia* suşlarını cins düzeyinde tanımlamasına rağmen Bcc'in tür düzeyinde ayırımını yapması limitlidir ve *B.glaiddoli*'nin ayırımını yapamamaktadır.

2.3.2. Moleküler Filojeni

Rutin klinik laboratuvarlarda Bcc'yi ayırt etmek için manuel veya otomatik ticari fenotipik testler kullanılmıştır. Türler arasında biyokimyasal sonuçlar yüksek benzerlik gösterdiğinden tür düzeyinde tanımlama başırlanamamıştır. Phoenix, VITEK 2, VITEK MS ve Bruker'i içeren otomatik tanımlama sistemleri Bcc'yi, farklı özellikteki Bcc olmayan türleri ve non-*Burkholderia* spp. tanımlar. Klinik örneklerde *Burkholderia* spp. tanımlanması ve ayırt edilmesinin doğruluğu, yakın komşuları olan *Pandoraea*, *Cupriavidus* ve *Ralstonia*'dan ayırt edilmesi hastaların tedavisi için esastır. Bu üç cins, *Burkholderia* cinsi dışında tanımlanan en yaygın cinslerdir. Çoğu zaman Bcc olarak fenotipik yanlış tanımlanırlar.

Bcc ve non-*Burkholderia* spp. geleneksel biyokimyasal yöntemler ile ayırt edilemezler. Bcc'nin ayırt edilmesinde 16S rRNA, *recA*, *hisA* ve *rpsU* gibi moleküler hedefler bildirilmiştir (26).

Coenye ve ark. (27) Bcc ve ilgili türlerin 16S rRNA dizilerini karşılaştırmışlardır, Bcc içindeki suşların benzerlikleri diğer *Burkholderia* türlerine (<% 97.0) kıyasla daha yüksek bulunmuştur (>% 97.7).

Bcc'nin referans suşlarının 16S rRNA gen dizilerini karşılaştırırken, Bcc' nin türlerinin filogenetik olarak çok yakından ilişkili olduğunu gösteren yüksek benzerlik değerleri (tipik olarak % 98'in üzerinde) ölçülmüştür. Ek olarak, bu türler ayrıca 16S rRNA gen dizilerinde % 2'ye kadar tür içi çeşitlilik sergilediğinden, tam 16S rRNA gen dizilerinin basit karşılaştırılması yoluyla tür düzeyinde güvenilir bir şekilde tanımlanamazlar.

rRNA genleri sınırlı taksonomik çözünürlüğe sahip olduğundan Mahenthiralingam ve ark. (28) *B. cepacia* kompleksinde tür tanımlaması için *recA* geninin kullanımını araştırmışlardır. Bazı çalışmalarda, bu bakterilerin *recA* genlerinin tipik olarak farklı Bcc türleri arasında % 94-95, Bcc türleri içinde % 98-99 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Türe özgü *recA* gen türevi primer çiftleri, *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA ve IIIB, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria* ve *B. anthina*'nın tanımlanması için geliştirilmiştir. Ancak daha sonraki çalışmalar bu testlerin bazılarının çok hassas veya spesifik olmadığını ortaya koymuştur (21).

2.3.3. Moleküler Yöntemler

Bcc türlerini ilgili cins/tür'lerden ayırt etmek için moleküler tanımlamalar gereklidir. Bcc ve Bcc olmayan türlerin ayırt edilmesinde kullanılan moleküler yöntemler tek başına değil çoklu hedef yaklaşımıyla değerlendirilmelidir. 16S rRNA, *recA*, *hisA* ve *rpsU* bildirilen bazı moleküler hedeflerdendir.

2.3.3.1. *hisA* ve *rpsU* gen sekansı

hisA geninin, histidin biyosentezinde rol oynayan bir enzimi kodladığı ve Bcc içindeki türlerin ayrımında kullanıldığı bildirilmiştir. Benzer bir şekilde *Burkholderia* cinsleri arasındaki farklı türleri tanımlamak için *rpsU* tanıtılmıştır. Tek bir hedef olarak *rpsU*'nun kullanılması, *Burkholderia* türlerinin tür düzeyinde ayrımında kullanılmasını kısıtlar.

2.3.3.2. *recA* Gen Sekanslaması ve 16s rRNA Sekansı

recA, *Burkholderia* türlerinin ayırt edilmesinde iyi bilinen hedeflerden biridir. *recA* 19 farklı *Burkholderia* türünü ayırmasıyla birlikte *Burkholderia* olmayan türleri ayıramaz. 16s rRNA sekanslaması *Burkholderia* türlerini, *Burkholderia* olmayan türlerden ayıran önemli bir opsiyondur.

2.4. Tüm Genom Sekanslama

Bakterilerin moleküler genetiğinde yaşanan son gelişmeler nedeniyle, bakteriyel patojenlerin tüm genom sekanslanması kullanımı klinik mikrobiyologlar arasında ilgi görmektedir. Tüm genom sekanslama verileri, patojenlerin tiplendirilmesine ve organizmanın tüm genom tek nükleotid polimorfizmlerine dayanan evrimsel paterninin belirlenmesine yardımcı olur. *B.cepacia* için 102 tane genom sekanslaması bulunmaktadır (29).

2.5. Multilokus Sekans Analizi

Bakteri taksonomisindeki gelişmelerden biri multilokus sekans analizi (MLSA)dir. Moleküler epidemiyoloji ve adlandırılmış türler içindeki suşları tanımlamak için tasarlanmış spesifik bir araç olan multilokus sekans tiplemesi (MLST)nin aksine, benzerlikler ve farklılıklar genellikle allelik profillerdeki farklılıklar olarak ölçülür. MLSA bunun yerine, farklı türleri ve cinsleri temsil eden suşlar arasındaki benzerlikleri ortaya çıkarmak için alellerin nükleotit sekanslarına dayanan filogenetik prosedürler kullanır. Bu tür çalışmaların birçok örneği yakın zamanda yayınlanmıştır ve genel olarak,

tanımlanan kümeler DNA-DNA hibridizasyon deneyleri ile sınırlandırılmış türlerle iyi ilişkilidir. Bu yaklaşım, özellikle yakından ilişkili türler içindeki ve arasındaki ilişkileri tasvir etmek için geleneksel 16S rRNA gen dizisi analizinden daha üstün bir çözünürlüğe sahiptir. Çıkarılan filogenetik ağaçlar sadece filogenetik bir omurga sağlamakla kalmaz, aynı zamanda karşılaştırmalı 16S rRNA dizi analizinin artık ayrımcı olmadığı bir seviyede türler arası ilişkileri ortaya koymaktadır (30).

Tanımlama (ve bir dereceye kadar sınıflandırma) amaçları için recA gen dizisi analizi ve MLSA, Bcc izolatlarının büyük çoğunluğunun tanımlanmasına izin verir.

Tablo 2-1: *Burkholderia cepacia* kompleks sınıflandırılması

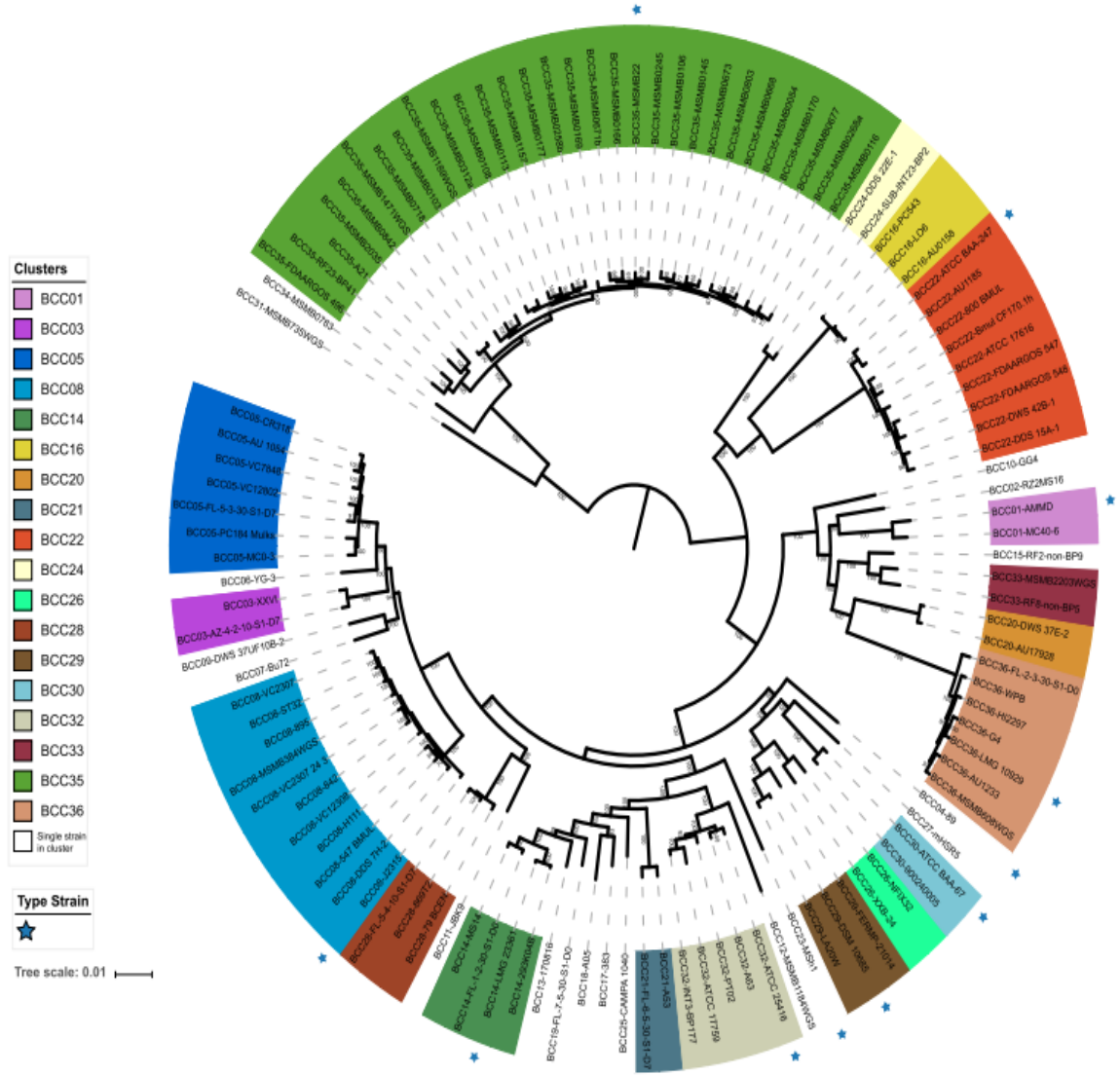
-
1. *Burkholderia ambifaria*
 2. *Burkholderia anthina*
 3. *Burkholderia arboris*
 4. *Burkholderia cenocepacia*
 5. *Burkholderia cepacia*
 6. *Burkholderia contaminans*
 7. *Burkholderia diffusa*
 8. *Burkholderia dolosa*
 9. *Burkholderia lata*
 10. *Burkholderia latens*
 11. *Burkholderia metallica*
 12. *Burkholderia multivorans*
 13. *Burkholderia pseudomultivorans*
 14. *Burkholderia pyrrocinia*
 15. *Burkholderia seminalis*
 16. *Burkholderia stabilis*
 17. *Burkholderia ubonensis*
 18. *Burkholderia vietnamiensis*
 19. *Burkholderia stagnalis*
-

20. *Burkholderia territorii*

21. *Burkholderia puraquae*

22. *Burkholderia catarinensis*

23. *Burkholderia paludis*



Şekil 2-1: 116 Bcc genomunun yeniden sınıflandırılması ile muhtemel maksimum filogenetik ağaç

Jin ve ark. (25) yaptıkları çalışmalar ile tüm genom verilerini kullanarak, mevcut Bcc türlerini 36 kümeye ayırmışlardır. Uygun düzeltme ve yeniden sınıflandırma ile, 36 kümenin 22'si mevcut 22 bilinen türü tanımlamıştır (Şekil 2.1). Diğer 14 küme de 14 potansiyel yeni tür olarak yeniden sınıflandırılmalıdır.

2.6. Burkholderia Türlerinde Antibiyotik Direnci

Son 10 yılda, bilimsel ve politik topluluklar antimikrobiyal direnci alarm veren bir halk sağlığı krizi olarak yorumlamışlardır. 2013 yılında CDC'nin bir dönüm noktası olarak yayınladığı rapora dayanarak, antimikrobiyal direncin her yıl 2 milyondan fazla insanı etkilediği ve ABD'de yılda minimum 23.000 ve Avrupa Birliği'nde 25.000 kişinin ölümüyle sonuçlandığını bilinmektedir (31). Bu rakamlar, İngiliz Hükümeti'nin Mayıs 2016'da ortaya koyduğu tahminle karşılaştırıldığında, yetkililer 2050 yılına kadar antimikrobiyal direnç nedeniyle küresel olarak her yıl yaklaşık 10 milyon insanın öleceğini tahmin ediyor (32). Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) ve Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) antimikrobiyal direnci dünya çapında insan sağlığına yönelik en büyük üç tehditten biri olarak görmektedirler (33). Bu bakteriyel patojenler arasında, iki laktoz ve glikoz fermente etmeyen Gram negatif bakteri, CDC raporunda, tehdit seviyesi ciddi olan mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır: Bunlar, çoklu ilaca dirençli *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'dir. Muhtemelen daha düşük enfeksiyon oluşturma insidansı nedeniyle diğer iki Gram negatif bakteri grubu listede yer almamıştır. Bunlar, *Stenotrophomonas maltophilia* ve Bcc türleridir. Düşük insidanslarına rağmen, bu iki mikroorganizma grubu da özellikle hastanede yatan ve immün sistemi baskılanmış hastalar için artan endişeleri temsil etmektedir. Özellikle bu bakteriler, geniş bir dizi antibiyotiğe karşı doğal dirençlidir ve mevcut tedavileri sadece birkaç aktif antibiyotik ile sınırlıdır (34).

Bakterilerde antimikrobiyal direnç temelde ikiye ayrılır: *İntrinsik antibiyotik direnci*, bir bakterinin antibiyotik maruziyetine yanıt olarak genetik değişikliğe tabi olmayan fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklanır. İntrinsik direncin en iyi bilinen örneği, bazı ilaç moleküllerinin Gram negatif bakterilerin hücre zarından, çoğunlukla dış zarın ve lipopolisakkarit ve porin bileşenlerinin yapısı nedeniyle geçiş yapamamasıdır. *Edinilmiş direnç*, daha önce bulunmayan bir direnç özelliğinin elde edilmesidir. Örneğin, kromozom olarak kodlanmış bir hedefin mutasyonu, yabancı direnç genlerini taşıyan plazmitlerin konjugasyon, faj aracılı transdüksiyon ve transformasyon gibi yollarla aktarılmasıdır. Bakteriler, genetik değişime bağımlı veya bağımsız antimikrobiyallere tolerans gösterebilirler (35).

Bakteriyel direnç mekanizmalarından bazıları şu şekildedir: 1) Hücre membranının aracılık ettiği sınırlama ile hücreye nüfuz etme veya hücre içine daha az nüfuz etme 2) Hücrede aktif atım pompası bulunması 3) Enzimatik inaktivasyon, ya substrat bölünmesi ya da kimyasal modifikasyon, örneğin asetilasyon, adenilasyon, glukosilasyon ve fosforilasyon 4) Nokta mutasyonları veya nadiren silme ile hedefi değiştirme, örneğin ribozomal RNA'nın metilasyonu yoluyla enzimatik olarak hedef modifiye edilebilir 5) Duyarlı bir hedefin dirençli bir hedef ile yer değiştirmesiyle metabolik bypass meydana gelmesi 6) Artmış transkripsiyon ve gen çoğalması ile hedef sayısındaki artış 7) Spesifik bağlayıcı proteinler tarafından ilaç sekresyonudur (35).

Bakteriler genellikle yüksek direnç elde etmek için sinerjistik olarak farklı mekanizmalar kullanırlar. *P. aeruginosa* ve *Burkholderia* türleri gibi enterik olmayan bakterilerin sıklıkla yüksek düzeyde edinilmiş veya doğal direnci, hücreye daha az nüfuz etme ve hücreden atım pompası sisteminin sinerjisinin büyük bir parçasıdır.

2.6.1. Bcc türlerinde β -Laktam Direnci

Seftazidim gibi β -laktam antibiyotiklere direnç, ilk olarak *B. cepacia*'nın PenA ve PenR (AmpR), şimdi PenV ve PenR (AmpR) olarak isimlendirilen, Bcc tarafından kodlanan sınıf A β -laktamazlardan kaynaklanır. PenB, Bcc boyunca yüksek oranda korunan geniş spektrumlu karbapenemaz karakterine sahip A Sınıfı penisilinazdır. Hem penB hem de ampC promotörleri, LysR tipi baskılayıcı PenR (AmpR) için bağlanma bölgeleri ile ilişkilidir. PenR iki işlevli bir proteindir. Peptidoglikan öncüsü UDP-MurNAc pentapeptidinin D-alanin-D-alanin pentapeptit kök terminalini bağladığında bir baskılayıcıdır. Bu proteinin daha önce, β -laktam antibiyotiklerin varlığında veya normalde onları parçalayan bir enzim olan AmpD'nin bozulmasından sonra üretilen 1,6-anhidro MurNAc peptitlerini bağladığı bulunmuştur. Bu bağlanma, PenR'nin bir aktivatör olmasına neden olur ve penB ve ampC hedeflerinin transkripsiyonuna yol açar. Sonuç olarak, seftazidime, sefotaksime ve meropeneme duyarlılıklar büyük ölçüde azalmıştır (36).

B. cenocepacia kromozom 2'de yerleşik ve *B. pseudomallei*'ye benzer Sınıf A PenA β -laktamaz içerir fakat *B. cenocepacia* enziminin henüz β -laktam direncine dahil olduğu gösterilmemiştir. İn vitro seçilmiş seftazidime direnci olan *B. thailandensis* mutantları sadece PenA (PenL) yapısal ve / veya düzenleyici mutasyonlar içerirken, *B. cenocepacia*'da aynı seçim ya PenB veya AmpC'yi aşırı ifade eden düzenleyici mutantlara

yol açar. PenB ve AmpC benzer substrat spektrumları sergiler ve her ikisi de LysR tipi PenR düzenleyici proteinin kontrolü altındadır. Dikkat çeken, sekanslanmış *B. cenocepacia* suşu J2315 PenB β -laktamazın, bu suşun doğal klavulanat direncini açıklayabilen bir Ser72Tyr substitüenti içermesidir (36) .

B. multivorans, Bcc bakterilerinde PenB ile yakından ilişkili bir PenA enzimi içerir. Klinik olarak en önemli serin karbapenemaz olan KPC-2'ye de benzerdir. *B. multivorans* ve *B. pseudomallei* PenA ile yakından ilişkilidir. Bununla birlikte, *B. multivorans* enzimi inhibitör-dirençli bir karbapenemaz iken, *B. pseudomallei* enzimi genişletilmiş spektrumlu bir β -laktamazdır. PenA'nın klinik olarak anlamlı *B. multivorans* β -laktam direncini tehlikeye atan terapideki rolü iyi belirlenmemiştir (36) .

2.6.2. Bcc türlerinde Atım Pompası

Bakteri genomları, en az 6 tane atım pompası ailesini kodlar. Bunlar: 1) *The major facilitator* (MFS) süperailisi; 2) *The resistance nodulation cell division* (RND) ailesi; 3) *The small multidrug resistance* (SMR) ailesi; 4) *The multi-drug and toxic compound extrusion* (MATE) ailesi; 5) *The ATP-binding cassette* (ABC) ailesi ve 6) *The proteobacterial antimicrobial compound efflux* (PACE) ailesidir (37). Bakterilerin çoğu, bu atım pompası ailelerinin her birinin birkaç üyesini kodlar ve *Burkholderia* türleri bir istisna değildir. Gram negatif bakterilerde, RND ailesinin atım pompaları, tüm hücre membranını kapsama kabiliyeti nedeniyle büyük öneme sahiptir, bu da dış membran geçirgenlik bariyeri ile atım pompası arasındaki sinerji ile yüksek seviyede direnç yol açabilir (35).

B. cenocepacia'da, RND ailesinin en az altı atım pompası, ilaç direncine dahil edilmiştir: RND-1, RND-3, RND-4, RND-8, RND-9 ve RND-10 (38, 39). *B. cenocepacia* direnç mekanizmalarının bir envanteri, bu bakteride atım pompası aktivitesinin yaygın olduğunu ve RND-3 pompa regülatöründeki mutasyonların, atım pompası aktivitesinin ve RND-3 aracılı antibiyotik direncinin ana nedeni olduğunu göstermiştir (40).

B. vietnamiensis'te, aminoglikozit direnci kronik enfeksiyon sırasında veya in vitro aminoglikozitlere maruz kaldıktan sonra ortaya çıkar ve büyük olasılıkla *B. pseudomallei* ve *B. thailandensis* AmrAB-OprA'nın bir homolog olan AmrAB-OprM atım pompası ekspresyonunun sonucudur (41). Atım pompası sistemlerinin çoklu ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyon ailesinin bir üyesi olan *B. vietnamiensis* NorM pompasının

sadece eksojen olarak eklenen tetrasiklin varlığında polimiksin B direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (42).

2.6.3. Bcc türlerinde Dış Membran Geçirgenlik Bariyeri

Membran geçirgenliği ve yapısındaki değişiklikler bu türlerde direnç belirleyicileri olarak gösterilmiştir. Örneğin atipik lipopolisakarit (LPS) yapısı, *Burkholderia* türlerinin katyonik peptitlere, özellikle polimiksin B'ye karşı intrinsik direncinde önemli bir rol oynar. Gram negatif bakterilerde polimiksin B direncine yol açan yaygın bir LPS modifikasyonu, lipit A'nın, ekli iki fosfat parçasının negatif yüklerini maskeleyen pozitif yüklü bir 4-amino-4-deoksi-arabinoz (Ara4N) kısmı ile modifikasyonudur. Majör lipit A *B. pseudomallei* ve *B. thailandensis* türlerinin her iki fosfat grubunda Ara4N ile modifiye edilmiş bir bifosforile disakkarit yapısı içerir. Ara4N varlığı, hücre duvarının net negatif yükünü etkili bir şekilde azaltır ve polimiksinler gibi katyonik antimikrobiyallerin nüfuzunu azaltır (43).

B. cenocepacia' da, bir amino arabinoz biyosentezi operon, LPS molekülünün toplam yükünü değiştiren Ara4N' nin sentezinden sorumludur. LPS molekülünün toplam yükünü değiştirir böylece katyonik antimikrobiyal peptitlere ve polimiksinlere karşı duyarlılığı azalır. Bakterilerin ekstratoplazmik strese yanıt vermesi için gerekli olan bir gen regülasyonunun ekspresyonunu kontrol eden alternatif sigma faktörü RpoE, *B. cenocepacia*' da 37 °C' de polimiksin B direncinde önemli bir rol oynar (43).

B. multivorans'da, hopanoid bileşiklerinin sentezi için gerekli olan genler de polimiksin direncinde rol oynar. İlginç bir şekilde, fosmidomisin kullanımı bu süreci kesintiye uğratarak *B. multivorans*'a karşı kolistin aktivitesini güçlendirebilir. İzoprenoid sentez yolunun bozulması yoluyla fosmidomisin, hopanoid sentezini önler ve membran kompozisyonunu değiştirir, sonuçta kolistin MİK değerlerinde 64 kat azalmaya neden olur (44).

Dış zar porin proteinleri, özellikle direnç enzimleri veya atım pompası ekspresyonu ile birlikte antimikrobiyal dirençte de rol oynar. Bcc türlerinin antibiyotik duyarlılığının azalmasında porinlerin rolü de vardır. *B. cenocepacia* gibi Bcc bakterileri, *P. aeruginosa*' ya benzer ve *Escherichia coli*' den yaklaşık 10 kat daha az bir geçirgenlik sergileyen genel porinler içerir. β -laktam dirençli KF *B. cenocepacia* izolatlarının ve dirençli bir mutantın, azalmış porin içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir (35).

2.6.4. Bcc türlerinde İlaç Hedeflerinin Değiştirilmesi

İlaç hedeflerini değiştiren nokta mutasyonları, bakterilerin antibiyotiklere karşı koymak için kullandığı en yaygın araçlardan biridir. Bu türlerdeki ilaç hedefi modifikasyonu çoğunlukla florokinolonlara direnç ile ilişkilendirilmiştir.

Kullanılan ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak, siprofloksasine dirençli *B. cenocepacia* mutantlarının in vitro seçimi, GyrA QRDR'de çoğunlukla Thr83Ile veya Asp87Asn mutasyonlarını vermiştir (45). Bunlar, siprofloksasin MİK değerlerinde 12-64 kat artış ile sonuçlanmıştır. Bcc'deki direnç mekanizmaları ile ilgili bir araştırmada incelenen levofloksasine dirençli izolatların çoğunda benzer gyrA mutasyonları tanımlanmıştır (40). Dirençli izolatlar, Gly81Asp, Thr83Ile ve Asp87His mutasyonlarını içermektedir.

Dihidrofolat redüktaz trimetoprimin hedefidir. Trimetoprim duyarlı ve trimetoprim dirençli *B. cepacia* suşlarından enzimin saflaştırılması, dirençli suştan alınan proteinin trimetoprim inhibisyonuna gerçekten dirençli olduğunu göstermiştir. Bu bulgu hedef değişikliğiyle tutarlı olmakla birlikte, bu azaltılmış inhibisyon için moleküler ve genetik temel oluşturulmamıştır (35).

Burkholderia türlerinin antimikrobiyallere olan direnci oldukça uzun süredir bilinmesine rağmen, genel direnç mekanizması halen tam olarak aydınlatılmamıştır. İlk olarak, dış zar geçirgenliği bariyeri *Burkholderia* türlerinde ilaç direncine önemli bir katkıda bulunur. Dış zar geçirgenliğinde iki önemli faktör LPS ve dış zar porlarıdır. LPS tipik olarak ilaç direncinde önemli bir rol oynar, ancak çoğu *Burkholderia* türünde katyonik peptitlere direnç oldukça önemlidir. Aminoarabinoz tarafından Lipid A modifikasyonu ve LPS çekirdeğindeki değişiklikler *Burkholderia* türlerinde yaygın doğal polimiksin direnci için temel belirleyicilerdir. Kısıtlayıcı porin proteinleri, özellikle atım pompası gibi diğer belirleyicilerle kombinasyon halinde ilaç direncine katkıda bulunan faktörlerdir. RND pompa aracılı atım, doğal ve edinilmiş çoklu ilaç direncine önemli katkılar sağlar. Türler bağli olarak, periplazmik veya membrana bağli β -laktamazlar doğal β -laktam direncinde ve klinik olarak anlamlı β -laktam antibiyotiklere karşı kazanılmış dirençte önemli roller oynarlar. Antibiyotik hedef mutasyonlarına bağli direnç çoğunlukla florokinolonlarla ilişkilendirilmiştir, ancak trimetoprim gibi diğer antibiyotiklere karşı direnç de gösterilmiştir. Ek olarak, şimdiye kadar tanımlanan *Burkholderia* direnç belirleyicilerinin hepsi olmasa da çoğu, ilgili organizmaların genomu

tarafından kodlanmaktadır. *Burkholderia* türlerinin genomları en az iki kromozomdan oluşur. Örneğin; Sekanslı prototip J2315 suşu üçüncü bir kromozom ve bir plazmid içeren *B. cenocepacia* gibi Bcc iki kromozomdan oluşurken, ancak diğer türler ek genetik elementler içerirler (46).

Bu cinsdeki hem doğal hem de edinilmiş direnç mekanizmalarının durumu, araştırmacılar ve klinisyenler için benzersiz ve genellikle zor bir durum meydana getirmiştir. Bu faktörlerin etkileşimini anlamak için daha fazla çalışma gereklidir.

2.7. Bcc'nin Tedavisi

Bcc'nin neden olduğu enfeksiyonların antimikrobiyal tedavisi, özellikle KF'li ve IV kateterleri olan hastalarda biyofilm oluşturma yetenekleri nedeniyle daha zordur. Klinisyenler, in vitro antibiyotik duyarlılık verilerini, önceki klinik yanıtları ve kendi deneyimlerini dikkate alarak her bir kişiyi ayrı ayrı değerlendirmeye devam etmelidir. Bcc ile enfekte olmuş KF'li kişilerde farklı antibiyotik rejimlerinin etkinliğini değerlendirmek için çok merkezli randomize klinik çalışmalara ihtiyaç vardır (47).

İntrinsik direnç diğer birçok antimikrobiyal sınıfın etkisini önlediğinden, Bcc enfeksiyonlarının tedavisi, seftazidime ve diğer geniş spektrumlu sefalosporinlere dayanır.

2.7.1. Monoterapi

Bcc'de non-fermantatif Gram negatif bakterilere kıyasla daha geniş bir antibiyotik direnci vardır. Penisilinler, sefalosporinler (seftazidim hariç), monobaktamlar, karbapenemler (meropenem hariç), polimiksinler, aminoglikozitler (*B. vietnamiensis* hariç) ve fosfomisine doğal olarak dirençlidirler. Ek olarak, Bcc genellikle non-fermantatif Gram negatif bakterilere karşı inaktif olan tüm antimikrobiyal sınıflara karşı dirençlidir. Bcc'ye etkili olabilen antibiyotikler ise: tikarsilin-klavulanat, piperasilin-tazobaktam, seftazidim, meropenem, minosiklin, siprofloksasin, levofloksasin, SXT ve kloramfenikol olarak sayılabilir. Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) SXT, tikarsilin-klavulanat, seftazidim, minosiklin, levofloksasin ve kloramfenikol için duyarlılık kriterleri yayınlamıştır (2). 50'den fazla araştırmanın özetlendiği bir çalışmada seftazidim, meropenem ve piperasilinin monoterapide veya SXT uygulamasının uygunsuz veya etkisiz olduğu durumlarda diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde uygun seçenekler olabileceği sonucuna varılmıştır (48).

2.7.2. Kombinasyon Tedavisi

2.7.1. bölümünde listelenen tedavi seçenekleri, iki veya daha fazla aktif antibiyotik kombinasyonu halinde de kullanılabilir. Bununla birlikte, KF veya KF'li olmayan hastalar için Bcc enfeksiyonları kombinasyon kemoterapisi hakkında veriler değişkenlik göstermektedir. Bu, gözlemlenen her direnç fenotipini oluşturan çok sayıda direnç mekanizmasının ve bunun altında yatan genetik heterojenitenin sonucudur. Ne yazık ki, mevcut terapötik çalışmalar çalışılan mikroorganizmaların genetik yapısını ve tedavi üzerindeki etkisini ele almamaktadır (49). Mikroorganizmaların moleküler karakterizasyonu ve direnç mekanizmalarının tanımlanması, “moleküler olarak hedeflenmiş terapi”, belirli bir konumda epidemiyolojik olarak baskın suşlara karşı etkili olacak bir kombinasyon kemoterapisi seçimini kesin olarak formüle etmek için gereklidir (50).

2.7.3. Yeni Tedaviler

Yeni bir ajan olan non- β -laktam β -laktamaz inhibitörü-avibaktam, Bcc'de mevcut olan PenA β -laktamaza karşı güçlü bir aktiviteye sahiptir ve bu nedenle, seftazidim-avibaktamın uygulanması, birinci basamak ajanların aktif olmadığı durumlarda bir seçenek olabilir. Yapılan bir çalışma, seftazidime avibaktam ilavesinin 49 adet seftazidime dirençli Bcc suşunun 35'inin MİK değerlerinde dört kat azalma ile sonuçlandığını göstermektedir (51). Başka bir çalışmada, seftazidime avibaktam ilavesi, KF hastalarından seftazidime dirençli *B. multivorans* izolatlarında seftazidime duyarlılığı da geri kazandırmıştır (52). Seftolozan-tazobaktam, bu gruptaki bazı organizmalara karşı in vitro aktiviteye sahiptir. Ancak, MİK aralığı geniş olmakla birlikte (≤ 0.5 ile > 64 $\mu\text{g/ml}$), türler arasında farklılıklar vardır ve klinik etkinlik değerlendirilmemiştir (53). Sefiderokol, yakın zamanda yapılan bir küresel araştırmaya dahil edilen 12 Bcc suşunun biri hariç hepsine karşı düşük MİK (≤ 4 $\mu\text{g/ml}$) değeri göstermiştir (54).

2.8. Cerageninler (Katyonik Steroid Antibiyotikler- CSA)

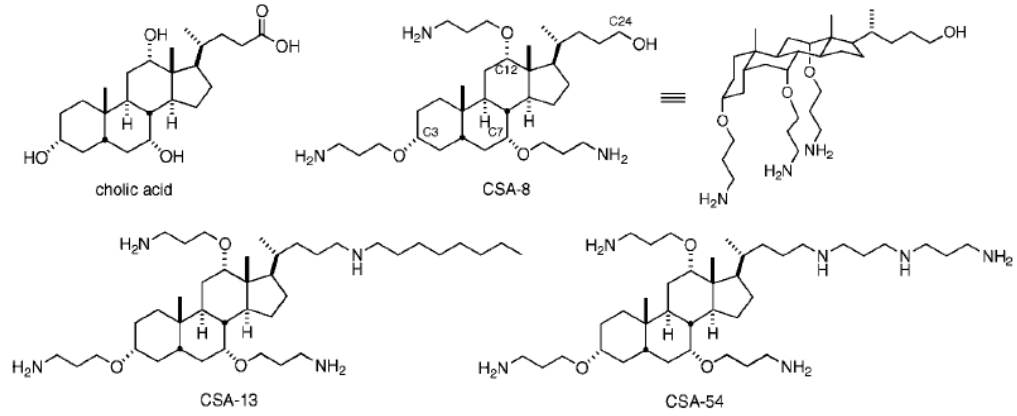
Çoklu ilaca dirençli bakteri suşlarının mevcut olarak kullanılan antibiyotiklere direncinin artmasıyla yeni antimikrobiyal maddelere gereksinim artmıştır. Gram pozitif bakterilere karşı gelişen direnç çok önemli olmakla birlikte Gram negatif bakterilerin oluşturduğu direnç de büyük bir öneme sahiptir. Hücre duvarı yapıları nedeniyle Gram negatif bakteriler birçok antimikrobiyal maddeye karşı dirençlidir. Ayrıca, kendilerine özgü direnç mekanizması olan Gram negatif bakteriler ortaya çıkmaktadır. Hem Gram

pozitif hem de Gram negatif bakterilerin insan sağığına verdiği tehdit, yeni antimikrobiyal hedeflerin (atım pompası, LPS sentezi, bakteriyel mRNA, hücre duvarı) araştırılmasını başlatmıştır. Bakteriyel membranlar, son zamanlarda çok çalışılan ilgi çekici bir hedef oluşturmaktadır, çünkü Gram pozitif ve Gram negatif bakteri membranlarının çoğu yapısal elemanını korur ve membran aktif antibiyotiklere direnç, membran yapısında büyük değişiklikler gerektirdiğinden; membranlar tarafından sağlanan geçirgenlik bariyerini etkilemektedir (4).

2.8.1. Cerageninlerin Hücre Duvarına Etki Mekanizmaları

Gram negatif bakterilerin hücre duvarı hidrofobik moleküllere karşı etkili bariyerdir. Sonuç olarak, Gram pozitif bakterilere karşı etkili bir çok antimikrobiyal, Gram negatif bakterilere karşı etkisizdir. Hücre duvarının geçirgenliği iki değerli katyonların (magnezyum ve/veya kalsiyum) lipit A molekülleri ile çapraz bağlanan köprülerle oluşturur. Lipit A ya da iki değerlikli katyonları bağlayan bileşikler, dış membranın yapısını bozar, geçirgenliğini artırır ve bakterileri, dış mebranı etkisiz olarak hareket ettiren hidrofobik antibiyotiklere karşı duyarlı hale getirir. Örneğin, bir katyon bağlayıcı olan nispeten yüksek konsantrasyonlardaki (milimolar) EDTA, Gram negatif bakterileri hidrofobik antibiyotiklere karşı duyarlı hale getirir (3) .

AMP'lerin doğal bağışıklıkta önemli bir yeri vardır ve bu peptitlerin azalması ile artmış enfeksiyonlar arasında bir ilişki vardır. Stabiliteleri ve maliyet sorunları AMP'lerin kliniklerde yaygın olarak kullanılmalarının önündeki engellerdendir. Böylece AMP'lerin peptit olmayan benzerleri geliştirilmiştir. İnsan katelisin LL-37 ve defensinler gibi AMP'ler, doğal bağışıklıkta merkezi bir rol oynamaktadır (Şekil 2.2). Örneğin, AMP'lerin vücutta az bulunması bakteriyel ve viral cilt enfeksiyonları, periodontal hastalıklar, ve idrar yolu enfeksiyonlarının görülme sıklığına neden olabilmektedir. Böceklerden memelilere kadar birçok organizmada bulunan AMP'lerin yaygınlığı ve bakterilerin genellikle bu bileşiklere duyarlı olması, bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde AMP'lerin geliştirilmesine ilgiyi arttırmıştır (55). Bununla birlikte, endojen AMP bileşiklerinin kompleks yapıda olması ve nispeten pahalı olması, AMP'lerin aktivitesinin tuza ve proteolitik bozulmaya duyarlı olması klinik kullanımlarında problemlere neden olabilmektedir. Sonuç olarak, AMP'lerin peptit olmayan benzerlerinin geliştirilmesi, peptit terapötiklerinin dezavantajları olmadan onlar üzerinde geliştirilen antimikrobiyal stratejilerin kullanılması için bir yol sağlayabilir (56).



Şekil 2-3: Kolik asit ve CSA-8, CSA-13 ve CSA-54'ün kimyasal yapıları

Cerageninler, AMP'lerin amfifilik morfolojisini taklit edecek şekilde tasarlanmıştır. Kolik asit iskelet yapısı kullanılarak AMP'lerin yapıları geliştirilerek oluşturulmuş, yeni antimikrobiyal etkili moleküllerdir (Şekil 2.3). Cerageninler ile yapılan çalışmalarda başlıca dört önemli özellik bulunmaktadır: 1) ilaca dirençli organizmalar da dahil olmak üzere doğrudan antibakteriyel aktiviteye sahip olmaları (Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler); 2) Cerageninlerin Gram negatif bakterileri hidrofobik antibiyotiklere duyarlı hale getirme yetenekleri; 3) Cerageninlerin antimikrobiyal aktivitelerinin antimikrobiyal peptitlerle korelasyonu; 4) yüzeylerin bakteriyel kolonizasyonunun önlenmesi için cerageninleri polimerlere bağlama yöntemleri (55).

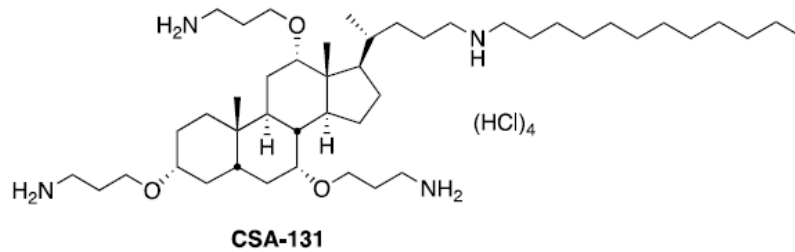
2.8.2. Cerageninlerin Antibakteriyel Aktivitesi

Cerageninlerle yapılan ilk çalışmalar ile, 24 no'lu karbon (C24)'dan uzanan grubun, C24'ten lipid zinciri ile genişletilmiş formlarının (Şekil 2.4), *E. coli* gibi Gram negatif bakterilere karşı düşük konsantrasyonlarda bakterisidal aktivite gösterdiği saptanmıştır (6) . Bununla birlikte, CSA-8'de olduğu gibi bu genişletilmiş zincir eğer molekülde bulunmuyorsa, molekül *E. coli* ve diğer Gram negatif bakterilere karşı etkisini kaybetmektedir. Lipit zinciri, Gram negatif bakterilerin hücre duvarından cerageninlerin geçişini kolaylaştırır. CSA-8 ise Gram negatif bakterileri hidrofobik antibiyotiklere karşı duyarlı hale getirerek dolaylı bir rol oynamaktadır. Örneğin, ilaca dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşuna sahip eritromisin ile MİK değeri 70 µg/ml iken aynı suşun CSA-8 ile MİK değeri <30µg/ml'dir (6) .

2.8.3. Cerageninlerin Bakteriyel Hücre Duvarına Karşı Etkisi ve Bakterisidal Aktivite

Cerageninlerin kilit etki mekanizması bakterilerin hücre duvarına etki etmesidir. Hedefi Gram negatif bakteriler olan cerageninler ise etkisini LPS'nin lipit A kısmına gösterir. Benzer amfifilik morfolojisi ve yük özellikleri göz önüne alındığında membran depolarizasyonu AMP'lerin ve cerageninlerin antibakteriyel aktivitesinde önemli bir adımdır. Cerageninlerin ve AMP'lerin benzer amfifilik morfolojisi ve yük özellikleri göz önüne alındığında bu antimikrobiyallerin benzer etki mekanizmaları sergilemesi beklenmektedir. Bu mekanizmaları ilişkilendirmek için, bakteriyel membran depolarizasyonunun kinetikleri, antimikrobiyallerin ölümcül olmayan dozlarına cevaben bakteriyel membran morfolojisindeki değişiklikler ve bakterilerin bileşiklere yanıt olarak eksprese ettiği genler araştırılmıştır. Membran depolarizasyonu AMP'lerin ve cerageninlerin antibakteriyel aktivitesinde önemli bir adımdır. Gram negatif bakterilerin, AMP'lerle etkileşimleri sonucunda, membran sızmaları meydana gelir ve bu, elektron mikroskopisi ve atomik kuvvet mikroskopisi ile gözlemlenmektedir. Elektron mikroskobu ve atomik kuvvet mikroskopisi görüntüleri, cerageninlere maruz kalan Gram negatif bakterilerin membranlarının morfolojisinde benzer değişiklikler göstermektedir (55).

Cerageninler, AMP'lerin peptit olmayan benzerleridir. Antibakteriyel etkilerinin yanı sıra antifungal etkileri de vardır. Cerageninlerin bu özellikleri onları KF ile ilişkili olanlar da dahil olmak üzere akciğerdeki kalıcı enfeksiyonlar için çekici potansiyel terapötikler haline getirir. Çoğu bakteriyel ve fungal patojenlerle, cerageninler düşük $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında inhibitör aktivite göstermektedir.



Şekil 2-4: Ceragenin CSA-131'in yapısı

2.9. Cerageninler ve Pluronik Miselleri

İlaç taşıyıcısı olarak çeşitli poloksamerler geliştirilmiştir. Poloksamer Pluronic® F127 iyi tanımlanmış miseller oluşturabilmektedir ve ilaçları sekrete ederek özel dokulara iletebilme özellikleri iyi aydınlatılmıştır (58, 59).

Yapılan çalışmalarda, non-iyonik sürfaktanların ve cerageninlerin kombinasyonlarının antibakteriyel aktiviteleri önemli ölçüde azaltmadan konak hücre sitotoksitesini azalttığı gözlemlenmiştir (60). Azaltılmış toksisite mekanizması büyük olasılıkla, cerageninlerin, pluronik tarafından oluşturulan misellerde geçici kapsüllenmesinden kaynaklanmaktadır. Misellerde kapsüle olmuş cerageninler, konakçı membranlarla birleşmeye daha az eğilimlidir, ancak cerageninlerin mikrobiyal membranlara karşı daha yüksek afinitesi ve misellerin dinamik doğası, cerageninlerin antimikrobiyal aktiviteleri etkilemesine izin verir. Bu şekilde, pluronik miseller, cerageninlerin membran seçiciliğini yükseltir.

Cerageninlerin yapısı bir safra asidi olan, kolik asit iskelet yapısını ve AMP'lerin amfifilik morfolojisini taklit eder. Bu morfoloji, cerageninlere, bakteriyel, mantar ve lipit zarflı virüslere karşı geniş spektrumlu etkinlik sağlamaktadır. Cerageninlerin yapısal sadeliği büyük ölçekte hazırlanmaya izin verir ve peptit bazlı olmadıkları için proteazlara substrat oluşturmazlar.

2.10. Cerageninlerin Antibiyotiklerle Kombinasyonu

Cerageninler, Gram negatif bakterilerin dış membranının etkileyerek bu membranın geçirgenliğini artırır. Cerageninler ile kombine olarak kullanılan antibiyotikler, hedef olarak sitoplazmik membrana etki ederek etkinliğini gösterir (56). Yapılan çalışmalar ile Gram negatif bakterilerden karbapenem dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'nin CSA'lar ile kullanılan antibiyotiklerle iyi bir sinerjistik etki gösterdiği ve bu bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonların tedavisi için iyi bir aday oldukları sonucuna varmışlardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakteri İzolatları

Yapılan çalışmada Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi'nde 2007-2017 yılları arasında 25 tanesi KF'li ve KF olmayan, erişkin ve çocuk hastalardan izole edilen 42 adet Bcc suşu kullanılmıştır. Bu suşlar geleneksel mikrobiyolojik yöntemler ve MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır. *Burkholderia* türleri saptandıktan sonra MLSA ile tanımlandırılması ve tiplendirilmesi de yapılmıştır (1).

Deney koşullarının standardizasyonu için ise *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 standart suşu kullanılmıştır (2).

3.2. Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler ve Çözeltiler

Çalışmamızda katyonik steroid antibiyotiklerden (Cationic Steroid Antibiotics-CSA) CSA-13, CSA-131 ve CSA-131-P (potens 1000 µg/mg) kullanılmıştır. CSA molekülleri kolik asit scaffold-yapılandırma tekniği kullanılarak (araştırmacı Paul B SAVAGE tarafından) sentezlenmiştir. Pluronic® F127, 2,3-bis- (2-metoksi-4-nitro-5-sülffeni)-2H-tetrazolium-5-karboksanilid ve menadion Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) temin edilmiştir.

Bu antibiyotiklerin yanı sıra günümüzde kliniklerde Bcc enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan seftazidim, levofloksazin, SXT (Sigma) antibiyotikleri (aktivitesi 1000 µg/ml), üretici firmalarından ayrı ayrı temin trimetoprim ve sülfametoksazol için sırasıyla 1/19 oranında hazırlanarak kullanılmıştır (2).

Tartılacak antibiyotik miktarı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$Ağırlık (mg) = \frac{\text{çözücünün hacmi (ml)} \times \text{istenilen konsantrasyon} \left(\frac{\mu g}{ml} \right)}{\text{potens} \left(\frac{\mu g}{mg} \right)}$$

Antimikrobiyal maddeler hassas terazide (Sartorius-CP224S) yukarıdaki formüle göre tartılmıştır. CSA'lar steril damıtılmış suda çözülmüştür. CLSI klavuzuna göre konvansiyonel olarak kullanılan antibiyotiklerden seftazidim için %10'luk sodyum karbonat çözeltisi, levofloksasin için 0,1 mol/l NaOH çözeltisi, meropenem için steril distile su, trimetoprim için 0,05 mol/L HCl çözeltisi ve sülfametoksazol için ise 2,5 mol/L NaOH çözeltisi çözücü olarak kullanılmıştır (2).

CSA-131-P'nin stabilitesinin bozulmaması için oda sıcaklığında kalan diğer stok 2560 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan stok antibiyotik çözeltileri deneylerde altı ay içinde kullanılmak üzere -20°'de saklanmıştır.

3.3. Besiyerlerinin Hazırlanması

Yapılan çalışmamızda Triptik Soy Agar (TSA) ve Mueller Hinton Buyyon (MHB) kullanılmıştır.

3.3.1. Triptik Soy Agar (TSA)

Toz halindeki TSA (Difco) üretici firma kullanım talimatlarına göre 40 gram tartılıp 1000 ml distile suda çözülecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti otoklavda (Hirayama) 1 atm basınç altında 121 derecede 15 dakika steril edildikten sonra Petri kutularına ortalama 15 ml olacak şekilde dökülmüştür.

3.3.2. Katyon İlaveli Mueller Hinton Bunyon (KİMHB)

Toz halindeki MHB besiyeri (Oxoid) üretici firma kullanım talimatlarına göre 21 gram tartılıp 1000 ml distile suda çözündürülmüştür. Hazırlanan çözelti otoklavda 1 atm basınç altında 121 derecede 15 dakika steril edildikten sonra kullanıma hazır hale gelmiştir. Üretici firmanın içerik tablosuna göre 1000 ml çözeltiliye eklenmesi gereken kalsiyum (Ca^{+2}) ve magnezyum (Mg^{+2}) katyonları sırasıyla tartılıp distile suda çözüldükten sonra membran filtreden (Sartorius 0,2 µm) geçirilerek steril edilmiştir. MHB'ye Mg^{+2} içeren çözeltiden 25 mg/l, Ca^{+2} içeren çözeltiden 50 mg/l olacak şekilde ilave edilerek KİMHB hazırlanmıştır.

3.3.3. Bakterilerin Saklanması için Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Hacettepe Üniversitesi'nden Anabilim Dalımıza gönderilen Bcc suşlarının, içinde TSA olan petrilere azaltma yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. 37°C' de 2 gün inkübasyona bırakılan suşların -80°C'deki derin dondurucuya konması için stok çözeltileri hazırlanmıştır.

Mikroorganizmalar TSA petrilere ekimi yapılarak taze kültürleri hazırlanmıştır. 37°C'de inkübasyona bırakılan petrilere tek düşmüş koloniler seçilmiştir. Tek düşen kolonilerin saflığı Gram boyama yöntemi ile kontrol edilmiştir. Steril edilen ependorfların üzerileri etiketlenmiştir. 30 gram tartılıp 1000 ml'de çözülen Triptik soy buyyon (TSB) besiyeri hazırlanmıştır. Bu besiyeri steril edilip kullanıma hazır hale

getirildikten sonra 250 µl alınarak ependorfa konulmuştur. Bir öze dolusu yaklaşık 3-4 adet tek düşmüş koloni TSB içeren ependorfa konulmuştur ve yüksek devirde karıştırılmıştır. Üzerine 750 µl gliserinli TSB eklenerek yeniden düşük hızda karıştırılıp hızlı bir şekilde -80°C'lik derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.3.4. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

Antibiyotik duyarlıklarının belirlenmesinde kullanılacak olan *Bcc* suşlarının 3.3.1'e göre hazırlanan stok kültürlerinden TSA petrilere azaltma yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra tek düşen 1-2 koloni bir öze yardımıyla toplanarak 2 ml KİMHBB içeren steril tüpe eklenmiştir, vortekslendikten sonra McFarland cihazında 0.5 McFarland bulanıklık olacak şekilde ayarlanmıştır. 0.5 McFarland bulanıklık, 10^8 koloni oluşturan birim (kob)/ml dir. 10^8 kob/ml içeren bakteri süspansiyonları mikrodilüsyon deneylerinde kullanılmak üzere 10^6 kob/ml'ye seyreltilmiştir. Bunun için 9.9 ml KİMHBB bulunan tüplere, 100 µl 10^8 kob/ml bakteri süspansiyonu eklenerek 1/100 seyreltme yapılmıştır.

3.4. Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

Yapılan çalışmamızda cerageninlerden CSA-13, CSA-131 ve CSA-131-P ile güncel tedavide kullanılan antibiyotiklerden SXT, levofloksasin ve seftazidim'lerin sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerleri belirlenmiştir (2).

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi için 96 kuyucuklu, U tabanlı ve steril mikroplaklar kullanılmıştır. 1 ve 2 numaralı sütunlara antibiyotiklerin KİMHBB'de seyreltilmiş hesaplanan konsantrasyonları 50 µl tatbik edilmiştir. Daha sonra 1. sütun hariç her kuyuya 50 µl KİMHBB eklenmiştir. Besiyeri eklendikten sonra 11. sütundan başlanarak 1. sütuna kadar 2-11 arasındaki kuyular arasında seri dilüsyon yapılmıştır. 11. sütundan yapılan seyreltme sonrası pipetteki 50 µl 12. kuyuya geçmeden atılmıştır. Hazırlanan antibiyotik konsantrasyonları mikroplakta 128-0.06 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra 10^6 kob/ml'ye seyreltilen bakteri süspansiyonlarından 50'şer µl alınarak her bir kuyuda final konsantrasyonu 5×10^5 olacak şekilde mikroplaklara dağıtılmıştır.

Yapılan çalışmanın kalite kontrolü için ise CLSI klavuzlarında *Bcc* için önerilen suş olan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 suşu kullanılmıştır.

Seri dilüsyonları tamamlanan ve bakteri süspansiyonu inokule edilen mikroplak steril bir kapak ile kapatılarak naylon bir kılıf geçirildikten sonra 37°C' de 18-24 saat

etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin görülmediği yani bulanıklık oluşturmayan en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Deneyler üç kere tekrar edilmiştir.

3.5. Minimum Bakterisidal Konsantrasyonlarının (MBK) Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda 42 adet Bcc suşuna karşı CSA-13, CSA-131 ve CSA-131-P'nin MİK değerleri saptandıktan sonra MBK değerleri araştırılmıştır.

TSA petrileri yatay ve dikey olarak eşit şekilde bölündükten sonra belirlenen MİK değerlerine eşit ve 2 kuyu daha fazla olan konsantrasyonlarından 2 tekrar olacak şekilde her kuyudan o konsantrasyona eşit 10 µl alınmıştır (2x10 µl). Petri kutusundaki TSA yüzeyine tatbik edilmiş, mikrobiyolojik güvenlik kabininde kurutulduktan sonra 37°C'lik etüvde bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün oluşan koloniler sayılarak, 3.3.4 kısmında bildirildiği gibi kob/ml'si saptanan inokulumun %0.1'ini temsil eden rejeksiyon değerine eşit veya altında olan sayı tayin edilmiştir. Bu şekilde rejeksiyon değeri (koloni sayısı) esas alınarak inokulumun %99.9'unu öldüren en düşük antibiyotik konsantrasyonu MBK değeri olarak kabul edilmiştir.

3.6. Antimikrobiyallerin “Zamana-bağlı Öldürme” Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitelerinin Saptanması

3.6.1. Antimikrobiyal Maddelerin Tek Başına Bakterisidal Etkilerinin Saptanması

Çalışmamızda kullanılan antimikrobiyal maddelerin tek başına ve kombinasyon halinde 5 adet Bcc suşuna karşı göstermiş oldukları $3\log_{10}$ > azalma bakterisidal etki olarak yorumlanmıştır.

Deneylerde MİK değerleri levofloksasin için 0.5-4 µg/ml, SXT için 1/19- 4/74 µg/ml, CSA-13 için 2-16 µg/ml, CSA-131 için 4-8 µg/ml, CSA-131-P için 2-8 µg/ml konsantrasyonlarında saptanan beş farklı Bcc suşu kullanılmıştır.

Suşların her bir antimikrobiyal madde için MİK değerleri belirlendikten sonra bu MİK değerlerinin 10xMİK 20xMİK ve 40xMİK konsantrasyonları hazırlanmıştır. Seçilen suşlar TSA petrilerine ekildikten sonra 37°C'de bir gece inkübe edilmişlerdir. Deney günü tek düşmüş koloniler ile McFarland cihazında 10^8 kob/ml'ye ayarlanmıştır. Daha sonra 10^7 kob/ml'ye seyreltilmiştir. Bu seyreltme işlemi için ise 9 ml KİMHB'a 10^8 kob/ml'den 1 ml ilave edilerek gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tüpler numaralandırılmıştır. Kontrol içeren tüp hariç diğer tüpler 8 ml KİMHB kontrol tüpüne

ise 9 ml KİMHB eklenmiştir. Konsantrasyonları ayarlanan antibiyotikler deney planındaki uygun tüplere 1 ml eklenmiş ve vortekslendikten sonra 10^7 kob/ml'ye ayarlanan bakteri süspansiyonu kontrol tüpü dahil 1 ml ilave edilmiştir. Böylece toplam tüpteki bakteri süspansiyonu 1/10 seyreltilerek 10^6 kob/ml'ye seyrelmiştir. 10 ml'lik tüpler vortekslendikten sonra 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde seyreltme yapılarak petri üzerine seyreltmeler 10 µl akıltılmış ve 24 saat etüvde inkübe edildikten sonra sayımları yapılmıştır. Deneyler iki kez tekrar edilmiştir.

3.6.2. Antimikrobiyal Maddelerin Kombinasyon Halinde Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması

Çalışmamızda ilk olarak kullanılan antimikrobiyal maddelerin tek başına oluşturdukları antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldıktan sonra makrodilüsyon "zamana-bağlı öldürme yöntemi" ile CSA-13, CSA-131 ve CSA-131-P'nin levofloksasin ve SXT ile kombinasyonu halindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Bunun için 3.4. bölümünde yapıldığı anlatılan deneyler sonunda antibiyotiklerin saptanan $1 \times \text{MİK}$ ve $4 \times \text{MİK}$ değerlerindeki çözeltileri kullanılmıştır. Deneylerde MİK değerleri levofloksasin için 0.5-4 µg/ml, SXT için 1/19- 4/74 µg/ml, CSA-13 için 2-16 µg/ml, CSA-131 için 4-8 µg/ml, CSA-131-P için 2-8 µg/ml konsantrasyonlarında saptanan beş farklı Bcc suşu kullanılmıştır.

Suşların her bir antimikrobiyal madde için MİK değerleri $10 \times \text{MİK}$ ve $40 \times \text{MİK}$ konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Seçilen suşlar TSA petrilere ekildikten sonra 37°C'de bir gece inkübe edilmişlerdir. Deney günü tek düşmüş koloniler ile McFarland cihazında 10^8 kob/ml'ye ayarlanmıştır. Daha sonra 10^7 kob/ml'ye seyreltilmiştir. Bu seyreltme işlemi için ise 9 ml KİMHB'a 10^8 kob/ml'den 1 ml ilave edilerek gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tüpler numaralandırılmıştır. Kontrol içeren tüp hariç diğer tüpler 7 ml KİMHB kontrol tüpüne ise 9 ml KİMHB eklenmiştir. Konsantrasyonları ayarlanan antibiyotikler eşit hacimde 1' er ml olacak şekilde eklenmiş ve vortekslendikten sonra 10^7 kob/ml'ye ayarlanan bakteri süspansiyonu kontrol tüpü dahil 1 ml ilave edilmiştir. Böylece toplam tüpteki bakteri süspansiyonu 1/10 seyreltilerek 10^6 kob/ml'ye seyrelmiştir. 10 ml'lik tüpler vortekslendikten sonra 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde seyreltme yapılarak petri üzerine seyreltmeler 10 µl akıltılmış ve 24 saat etüvde inkübe edildikten sonra sayımları yapılmıştır. Deneyler iki kez tekrar edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar zaman 'x' ekseninde, logaritmik olarak ifade edilen bakteri sayısı 'y' ekseninde olacak şekilde gösterilerek zamana-bağlı öldürme eğrileri çizilmiştir.

Sonuçlar Ulusal Klinik Laboratuvar Standardı Komitesi (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) verilerine göre aşağıdaki gibi yorumlanmıştır :

- 1) Sinerjist etki: Antibiyotiklerin 24. saatte kombinasyon halinde oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısının, kombinasyonda bulunan antibiyotiklerden daha aktif olanın tek başına oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısına göre 100 kat ya da daha fazla ($\geq 2 \log_{10}$) azalmış olması sinerjist etki olarak kabul edilmiştir (61).
- 2) Aditif etki: Antibiyotiklerin 24. saatte kombinasyon halinde oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısının, kombinasyonda bulunan antibiyotiklerden daha aktif olanın tek başına oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısına göre <10 kat ($1 \log_{10}$) azalmış ya da artmış olması additif etki olarak kabul edilmiştir (61).
- 3) Antagonist etki: Antibiyotiklerin 24. saatte kombinasyon halinde oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısının, kombinasyonda bulunan antibiyotiklerden daha aktif olanın tek başına oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısına göre 100 kat ya da daha fazla ($\geq 2 \log_{10}$) artmış olması antagonist etki olarak kabul edilmiştir (61).

4. BULGULAR

4.1. MİK Değerlerine Ait Bulgular

4.1.1. Deney Koşullarının Standardizasyonuna Ait Bulgular

Çalışmada deney koşullarının standardizasyonu için *P. aeruginosa* ATCC® 27853 standart suşu kullanılmış ve mikrodilüsyon yöntemi ile bu suşun meropeneme karşı saptanan MİK değerleri 0.25-1 µg/ml olup çalışma süresince CLSI tarafından önerilen sınırlar içerisinde kalması kriter olarak alınmıştır (2).

CSA-13, CSA-131 ve CSA-131-P antibiyotiklerinin MİK değerleri CLSI'da henüz bulunmamaktadır.

4.1.2. Klinik Örneklerden İzole Edilmiş Bcc Suşlarına Ait Bulgular

Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi'nden KF ve KF'li olmayan erişkin ve çocuk hastalardan izole edilen Bcc olarak tanımlanan ve çalışmaya alınan 42 izolat yine aynı laboratuvarında MALDI-TOF MS ve MLSA ile tür ayrımı yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan 42 adet Bcc suşuna CSA-131, CSA-131-P, CSA-13, meropenem, seftazidim, SXT ve levoflaksasinin MİK değerleri (µg/ml) sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle saptanmıştır. Saptanan MİK değerlerinin sınırları, suşların % 50'sini (MİK₅₀) ve % 90'ını (MİK₉₀) inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonlarına ait bulgular Tablo: 4.1'de gösterilmiştir. Zamana-bağlı öldürme deneylerinde 5 adet Bcc suşu kullanılmış ve bu suşlardan B1 suşu *B. multivorans*, B2 suşu Bcc, B3 suşu *B. glaidoli*, B4 suşu *B. contaminans* ve B5 suşu Bcc olup, MİK değerlerine ait bulgular Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Antimikrobiyal maddelerin 42 adet Bcc suşuna karşı saptanan MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri (µg/ml)

Antimikrobiyal Maddeler	MİK Aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀
CSA-131	4-128	16	64
CSA-131-P	2-128	16	128
CSA-13	2-128	16	128
Meropenem	1-128	8	16
Seftazidim	2-128	16	128
Trimetoprim-Sülfametoksazol	0,12/3,75- >4/76	1/19	>4/76
Levofloksasin	0,12-64	2	32

Tablo 4-2: Zamana- bağlı öldürme deneylerinde kullanılan 5 adet Bcc suşunun MİK değerleri (µg/ml)

Antimikrobiyal Maddeler	CSA-13	CSA-131	CSA-131-P	Seftazidim	Meropenem	Levofloksasin	Trimetoprim-Sülfametoksazol
B1 Suşu (<i>B.multivorans</i>)	16	8	4	2	2	2	1/19
B2 Suşu (Bcc)	16	8	8	8	8	2	1/19
B3 Suşu (<i>B. glaidoli</i>)	2	8	4	32	2	0.5	1/19
B4 Suşu (<i>B. contaminans</i>)	16	8	4	8	2	0.5	4/76
B5 Suşu (Bcc)	16	4	2	128	128	4	4/76

CLSI'nın mikrodilüsyon duyarlılık kriterlerine göre konvansiyonel antibiyotiklere duyarlı ve dirençli sınırları Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4-3: CLSI kılavuzuna göre antimikrobiyal maddelerin duyarlılık sınırları

Antimikrobiyal Maddeler	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Seftazidim	≤ 8	16	≥ 32
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16
Levofloksasin	≤ 2	4	≥ 8
Trimetoprim-Sülfametoksazol	≤ 2/38	-	≥ 4/76

Bu veriler doğrultusunda çalışılan 42 suşun antibiyotik duyarlılıkları Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4-4: 42 adet Bcc suşunun antibiyotik duyarlılığı

Antimikrobiyal Maddeler	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Seftazidim	20	7	15
Meropenem	16	8	18
Levofloksasin	22	7	13
Trimetoprim-Sülfametoksazol	30	-	12

4.2. MBK Değerlerine Ait Bulgular

Çalışmada kullanılan 42 adet Bcc suşuna karşı CSA-13, CSA-131, CSA-131-P'in mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan MBK değerlerinin ($\mu\text{g/ml}$) sınırları sırasıyla 8-128, 4-128, 4-128 olarak saptanmıştır. Standart suşa karşı ise MBK değeri MİK değerine eşit olarak bulunmuştur. Saptanan MBK değerlerinin sınırları, suşların % 50'sinin (MBK₅₀) ve % 90'ının (MBK₉₀) en düşük bakterisidal konsantrasyonlarına ait bulgular Tablo 4.5'de gösterilmiştir.

Çalışmamızda denenen antibiyotiklere ait MBK değerlerinin MİK değerlerine eşit veya iki katı konsantrasyonlarda bulunması, bu antibiyotiklerin Bcc enfeksiyonların tedavisinde istenilen bakterisidal etkiyi oluşturabileceklerini göstermektedir.

Tablo 4-5: Antimikrobiyal maddelerin 42 Bcc suşuna karşı saptanan MBK aralığı, MBK₅₀ ve MBK₉₀ değerleri ($\mu\text{g/ml}$)

Antimikrobiyal Maddeler	MBK aralığı	MBK ₅₀	MBK ₉₀
CSA-13	8-128	32	128
CSA-131	4-128	32	128
CSA-131-P	4-128	32	128

4.3. Antimikrobiyal Maddelerin “Zamana-bağlı Öldürme” Eğrilerine ait Bulgular

4.3.1. Antimikrobiyal Maddelerin Tek Başlarına Oluşturduğu Bakterisidal Etkilere Ait Bulgular

Çalışmada CSA-13, CSA-131 ve CSA-131-P'in tek başlarına Bcc suşlarına karşı oluşturdukları bakterisidal etkiler zamana-bağlı öldürme eğrileri yöntemi ile araştırılmış ve bunlara ait bulgular Tablo 4.5 ve Tablo 4.6' da gösterilmiştir.

4.3.2. Antimikrobiyal Maddelerin Kombinasyon Halinde Etkilerinin Zamana-Bağlı Öldürme Eğrilerine Ait Bulgular

Çalışmada kullanılan tüm CSA'lar (CSA-13, CSA-131, CSA-131-P) levofloksasin ve SXT ile kombine edilmiştir. Kombinasyonların oluşturdukları etkiler zamana-bağlı öldürme yöntemi ile araştırılmış ve zamana-bağlı öldürme eğrileri çizilmiştir. CSA-13 için MİK değerleri 2-16 µg/ml, CSA-131 için 4-8 µg/ml ve CSA-131-P için MİK değerleri 2-8 µg/ml arasında saptanan beş adet Bcc suşu kullanılmıştır. Denenen antimikrobiyal maddelerin MİK ve 4xMİK'de tek başına ve kombinasyon halinde etkileri seçilen suşlara karşı araştırılmıştır. B1 suşuna karşı denenen antimikrobiyal maddelerin MİK, ve 4xMİK değerlerine ait zamana-bağlı öldürme eğrileri sırasıyla Şekil 4.1'de, B2'ye karşı antimikrobiyal maddelerin MİK, ve 4xMİK değerlerine ait zaman-ölüm eğrileri sırasıyla Şekil 4.2'de, B3'e karşı antimikrobiyal maddelerin MİK, ve 4xMİK değerlerine ait zamana-bağlı öldürme eğrileri sırasıyla Şekil 4.3'de, B4'e karşı antimikrobiyal maddelerin MİK, ve 4xMİK değerlerine ait zamana-bağlı öldürme eğrileri sırasıyla Şekil 4.4'de, B5'e karşı antimikrobiyal maddelerin MİK, ve 4xMİK değerlerine ait zamana-bağlı öldürme eğrileri sırasıyla Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Bu yöntem ile yapılan tek başına oluşturduğu etkilere ve antibiyotiklerin kombinasyon halindeki etkilerine ait bulgular ise sırasıyla Tablo 4.6' ve Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4-6: Antimikrobiyal maddelerin tek başına oluşturduğu etkilere ait ortalama bulgular

Antimikrobiyal maddeler ve kombinasyonlar (µg/ml)	Belirlenen inkübasyon zamanlarında log ₁₀ 'luk azalma gösteren suş sayısı											
	2. saat			4. saat			6. saat			24. saat		
	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
CSA-13												
1xMİK	2	1	0	2	0	2	2	1	2	0	1	0
4xMİK	2	1	2	0	1	4	0	1	4	1	1	3
CSA-131												
1xMİK	1	1	1	0	0	3	0	1	3	0	0	0
4xMİK	0	2	3	0	2	3	0	3	2	1	1	0
CSA-131-P												
1xMİK	2	3	0	2	3	0	2	2	1	0	0	0
4xMİK	0	0	5	0	0	5	0	0	5	2	0	1
Levo												
1xMİK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4xMİK	2	1	2	1	1	3	1	2	2	1	0	2
SXT												
1xMİK	0	0	0	2	1	0	1	1	0	1	2	0
4xMİK	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0

3 log₁₀ kob/ml ya da daha fazla azalma göstermesi bakterisidal aktivite olarak tanımlanmıştır,

Tablo 4-7: Antimikrobiyal maddelerin kombinasyon halinde oluşturduğu etkilere ait ortalama bulgular

Antimikrobiyal maddeler ve kombinasyonlar (µg/ml)	Belirlenen inkübasyon zamanlarında log ₁₀ 'luk azalma gösteren suş sayısı											
	2. saat			4. saat			6. saat			24. saat		
	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3	-1	-2	-3
CSA-13+Levo (1)												
1xMİK	2	1	2	0	2	3	0	1	4	0	0	4
4xMİK	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5
CSA-13+ SXT (1)												
1xMİK	3	1	1	1	2	2	0	2	3	2	1	2
4xMİK	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5
CSA-131+Levo (1)												
1xMİK	2	1	0	0	2	1	0	2	1	0	1	0
4xMİK	1	0	4	0	1	4	0	0	5	1	1	2
CSA-131 + SXT (1)												
1xMİK	2	1	0	1	2	1	0	3	0	1	1	1
4xMİK	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	2
CSA-131-P + Levo(2)												
1xMİK	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
4xMİK	1	1	2	0	1	3	0	1	3	0	2	2
CSA-131-P + SXT (1)												
1xMİK	0	0	0	2	0	0	0	1	0	1	0	2
4xMİK	2	0	1	2	0	1	2	0	1	1	0	3

- (1) Antibiyotiklerin 24. saat sonunda kombinasyonda daha aktif olan antibiyotiğe göre 100 kat ya da daha fazla azalma göstermesi sinerjist etki olarak tanımlanmıştır.
 (2) Antibiyotiklerin 24. Saat sonunda kombinasyonda daha aktif olan antibiyotiğe göre 10 kat azalmış ya da artmış olması aditif etki olarak tanımlanmıştır.

24 saatin sonunda **1xMiK CSA-13+ 1xMiK levofloksasin** kombinasyonlarında, çalışılan beş suşun dördünde sinerjist etki saptanırken, aynı kombinasyonda erken sinerjizm 2. saatte iki suшта gözlenmekle birlikte 4. ve 6. saatte tüm suşlarda sinerjizm gözlenmiştir. 4xMİK CSA-13 + 4xMİK levofloksasin kombinasyonlarında beş suşun beşinde sinerjist etki saptanmıştır. Sonuç olarak, çalışılan tüm konsantrasyonlarda CSA-13 ve levofloksasin kombinasyonlarında Bcc suşlarına karşı sinerjist etki saptanmıştır.

1xMiK CSA-13+ 1xMiK SXT kombinasyonlarında, çalışılan beş suşun üçünde sinerjist etki gözlenirken, 6. saatte beş suşun hepsinde sinerjist etki gözlenmiştir. 4xMİK CSA-13 ve 4xMİK SXT kombinasyonlarında beş suşun hepsi sinerjist etki göstermiştir.

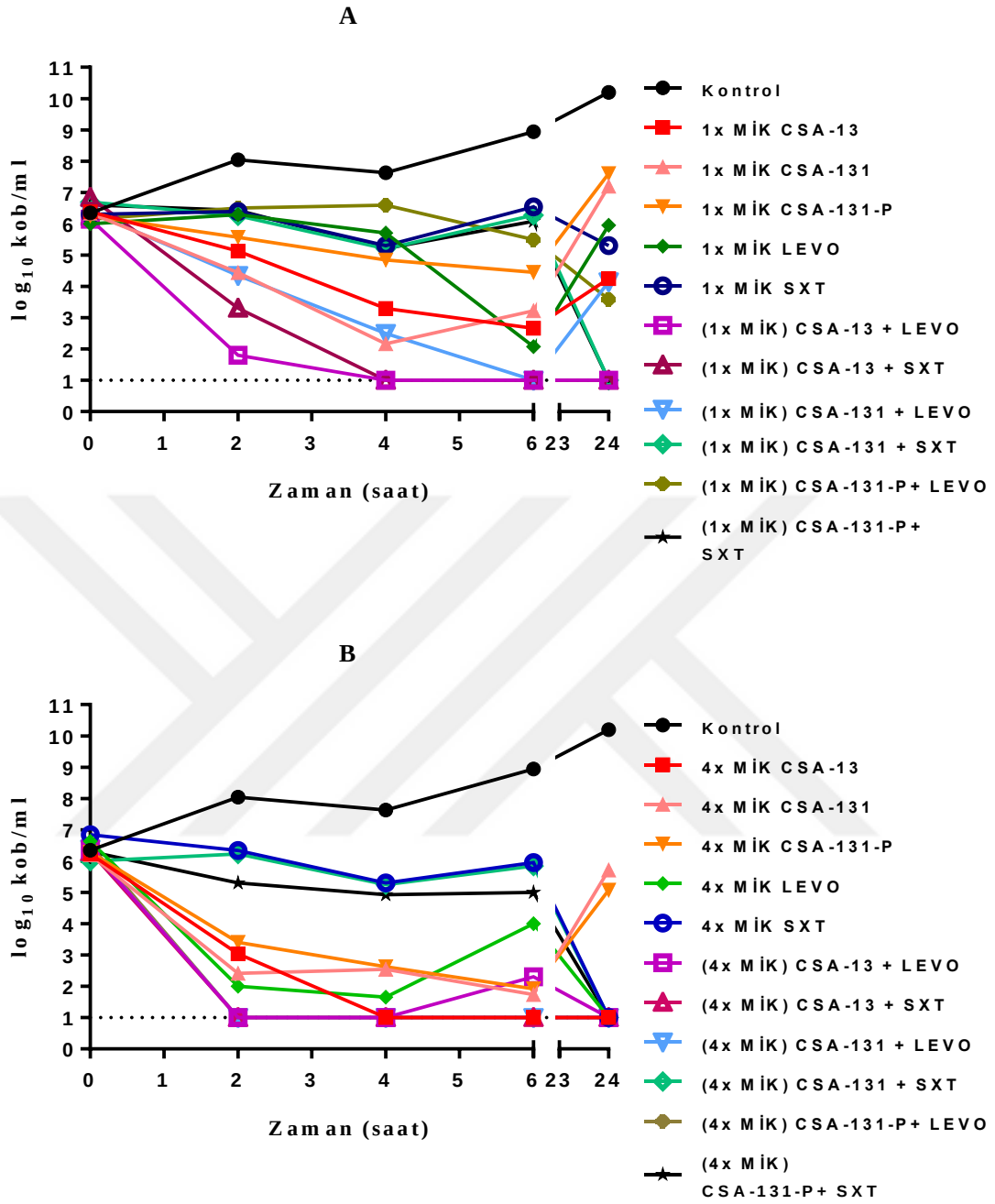
1xMiK CSA-131+ 1xMiK levofloksasin kombinasyonlarında, çalışılan beş suşun birinde sinerjist etki saptanırken, aynı kombinasyonda erken sinerjizm 2. saatte de gözlenmiştir. 4xMİK CSA-131+ 4xMİK levofloksasin kombinasyonlarında çalışılan beş

suşun üçünde sinerjistik etki gözlenirken, 4. ve 6. saatte çalışılan beş suşun tamamında sinerjizm gözlenmiştir.

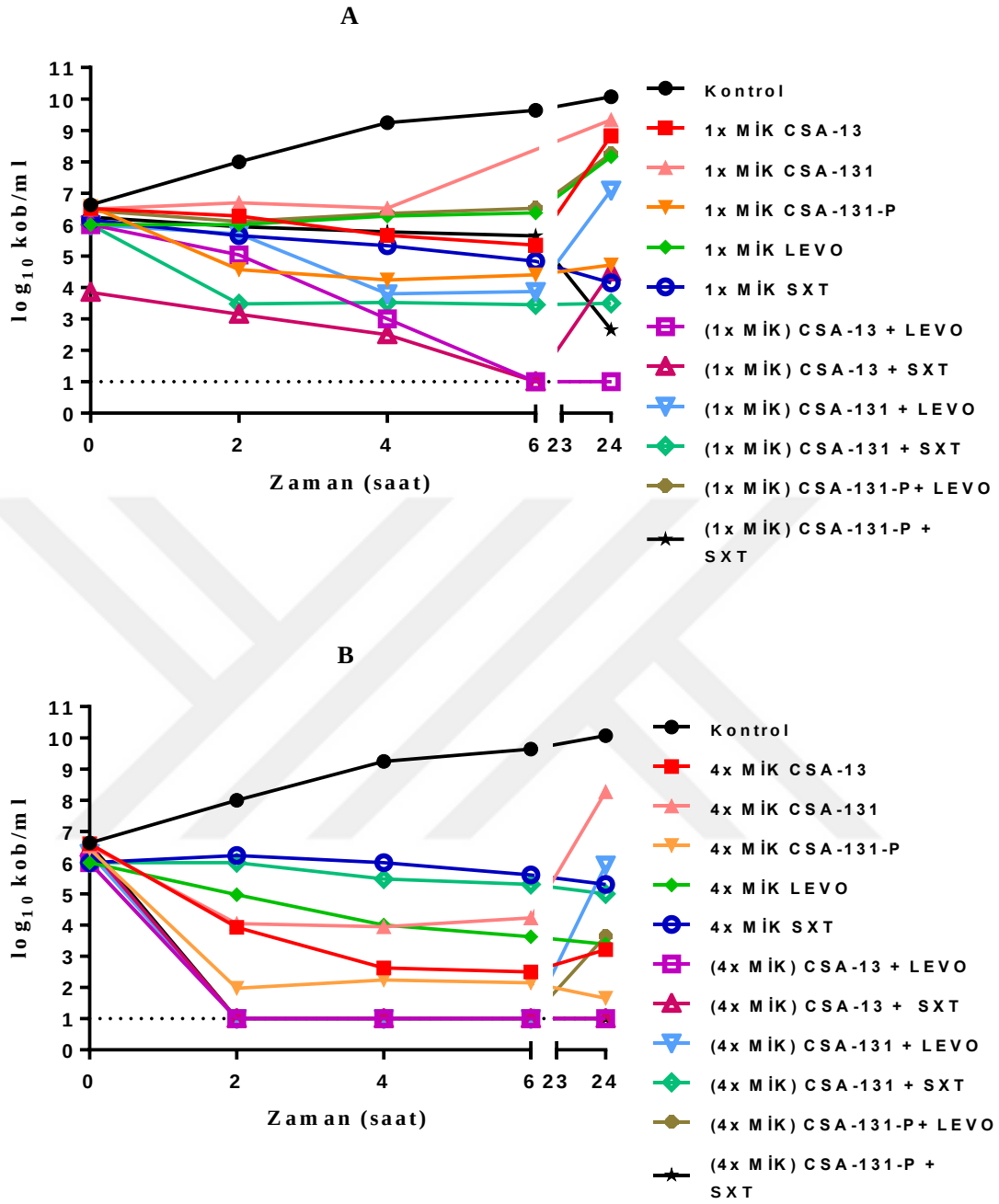
1xMİK CSA-131+ 1xMİK SXT kombinasyonlarında, çalışılan beş suşun ikisinde sinerjistik etki gözlenirken, aynı kombinasyonda erken sinerjizm 2. saatte de gözlenmiştir. **4xMİK CSA-131+ 4xMİK SXT** kombinasyonlarında çalışılan beş suşun ikisinde sinerjistik etki saptanırken erken sinerjizm 2. saatte gözlenmiştir.

1xMİK CSA-131-P+ 1xMİK levofloksasin kombinasyonlarında, çalışılan beş suşun birinde sinerjistik etki gözlenirken, 6. saatte çalışılan beş suşun birinde aditif etki görülmüştür. **4xMİK CSA-131-P+ 4xMİK levofloksasin** kombinasyonlarında çalışılan beş suşun dördünde sinerjistik etki saptanmıştır.

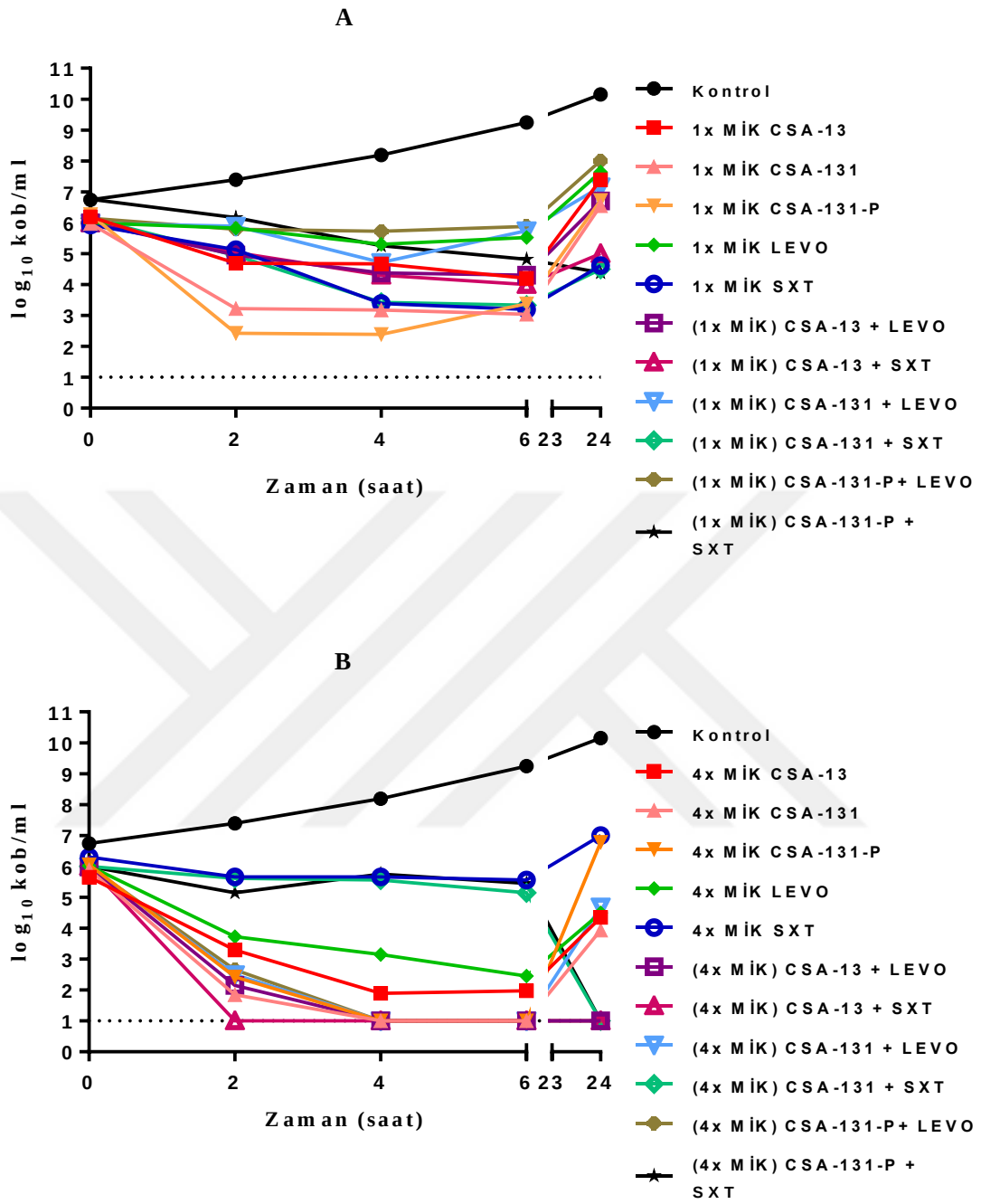
1xMİK CSA-131-P+ 1xMİK SXT kombinasyonlarında, çalışılan beş suşun ikisinde sinerjistik etki gözlenirken, erken sinerjizm 6. saatte çalışılan beş suşun birinde gözlenmiştir. **4xMİK CSA-131-P+ 4xMİK SXT** kombinasyonlarında, çalışılan beş suşun üçünde sinerjistik etki gözlenmiştir.



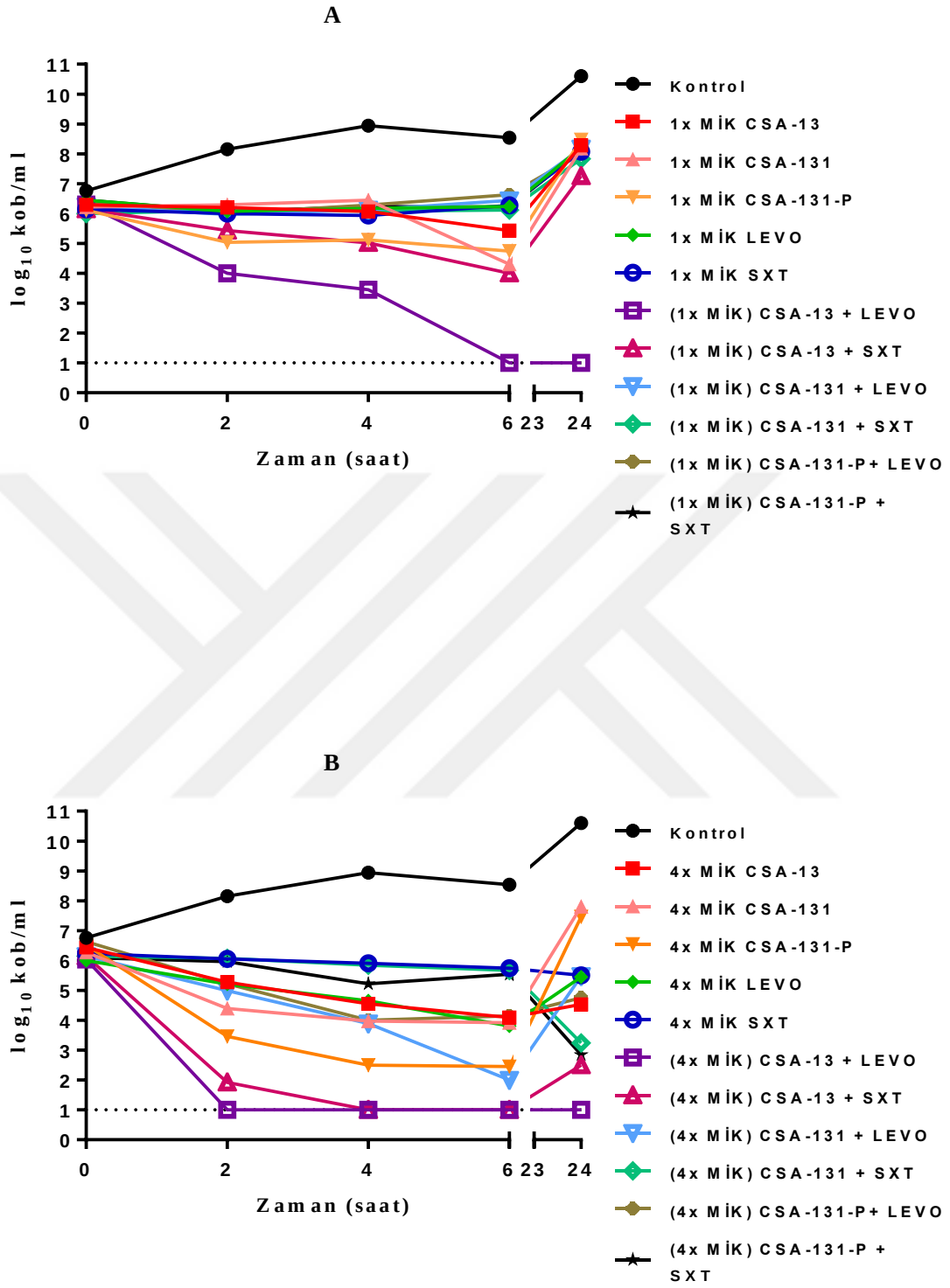
Şekil 4-1: Antimikrobiyal maddelerin A) MİK ve B) 4xMİK’de tek başlarına ve kombinasyon halinde B1 suşuna karşı elde edilen zamana-bağılı öldürme eğrilerine ait bulgular



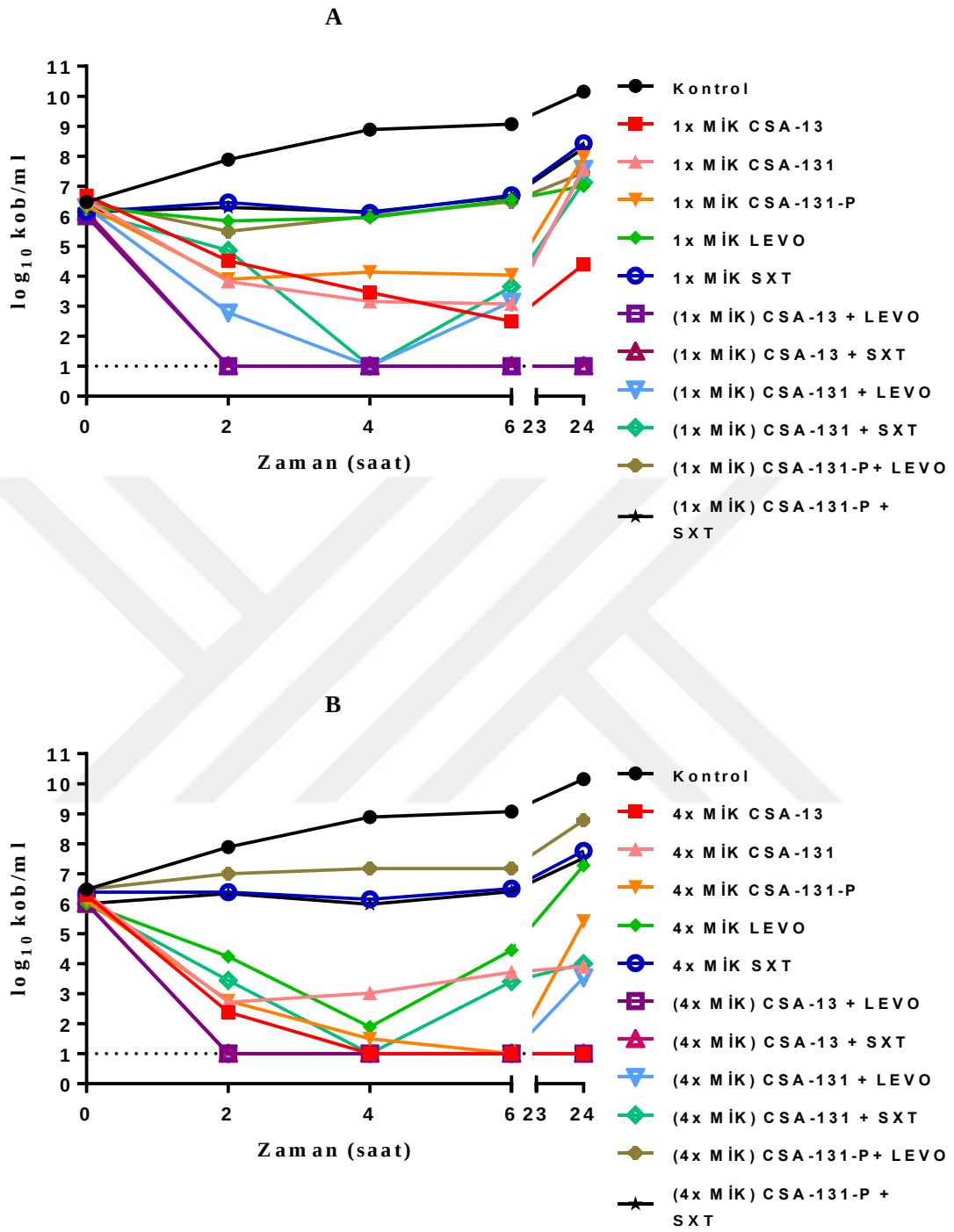
Şekil 4-2: Antimikrobiyal maddelerin A) MİK ve B) 4xMİK’de tek başlarına ve kombinasyon halinde B2 suşuna karşı elde edilen zamana-bağlı öldürme eğrilerine ait bulgular



Şekil 4-3: Antimikrobiyal maddelerin A) MİK ve B) 4xMİK’de tek başlarına ve kombinasyon halinde B3 suşuna karşı elde edilen zamana-bağlı öldürme eğrilerine ait bulgular



Şekil 4-4: Antimikrobiyal maddelerin A) MİK ve B) 4xMİK’de tek başlarına ve kombinasyon halinde B4 suşuna karşı elde edilen zamana-bağılı öldürme eğrilerine ait bulgular



Şekil 4-5: Antimikrobiyal maddelerin A) MİK ve B) 4xMİK’de tek başlarına ve kombinasyon halinde B5 suşuna karşı elde edilen zamana-bağlı öldürme eğrilerine ait bulgular

5. TARTIŞMA

Bcc toprakta ve bitkilerde yaşayan en az 23 adet farklı, birbirleriyle yakın türlerden oluşan Gram negatif patojenlerdir ve özellikle KF' li hastaların %3-4 kadarının akciğerlerinde bulunmaktadır (62). Bcc türleri özellikle KF'li hastalarda kronik solunum enfeksiyonları oluşturduğu için önemlidir. KF beyaz ırkta en sık görülen genetik bir hastalıktır. KF'li hastalar fazla miktarlarda temizlenmesi zor kalın mukus üretirler. Bu mukus akciğer ve sindirim sistemlerini bloke eder ve enfeksiyonlara yol açar. Bu kompleksin neden olduğu hastalıkların tedavisi çok zordur ve diğer akciğer enfeksiyonlarından daha hızlı kötüleşir (63). KF hastalarında Bcc enfeksiyonları akciğer fonksiyonlarında hızlı bir düşüşle bağlantılı olarak düşük prognoza, hastanede kalış süresinin uzamasına ve ölüm riskinin artmasına neden olmaktadır. Bcc suşlarının in vitro ve in vivo biyofilm oluşturabilme yeteneği antibiyotik duyarlılığının azalmasına, tedavinin başarısızlığına ve enfeksiyonların sık görülmesine neden olmaktadır. Bu enfeksiyonların epidemiyolojisi değişiklik göstermekle birlikte kompleksin sahip olduğu doğal direnç nedeniyle tedavisi zordur. Bcc suşları, aminoglikozit, polimiksin, birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler, karboksipenisilinler ve β - Laktam antibiyotikler dahil olmak üzere geniş bir antimikrobiyal ajan yelpazesine karşı doğal olarak dirençlidir. KF ilişkili Bcc enfeksiyonları sıklıkla tobramisin, meropenem, seftazidim, piperasillin veya SXT gibi antibiyotiklerin kombinasyonu ile tedavi edilmektedir. FDA kılavuzuna göre levofloksasin, SXT, meropenem için duyarlılık testleri için yorumlayıcı kriterler tanımlanmamıştır. Antibiyotik seçimi, ilaç reaksiyonları, toksisiteler ve diğer ilaçlarla etkileşimler dahil olmak üzere bir dizi faktöre bağlıdır. En uygun antibiyotik seçimi, semptomların en hızlı şekilde çözülmesine ve diğer belirtilerin (örneğin radyoloji, akciğer fonksiyonu ve inflamatuvar belirteçler) en az toksisite ile düzeltilmesine yol açacaktır. Son 10 yılda, bilimsel ve politik topluluklar antimikrobiyal direnci alarm veren bir halk sağlığı krizi olarak yorumlamışlardır. Günümüzde, Bcc ile enfekte olan kişilerde kullanılabilecek etkili tedaviler hakkında çok az rehber bulunmaktadır (64).

2013 yılında CDC' nin yayınladığı rapora dayanarak, antimikrobiyal direncin her yıl 2 milyondan fazla insanı etkilediğini ve ABD' de yılda minimum 23.000 ve Avrupa Birliği' nde 25.000 kişinin ölümüyle sonuçlandığını bilmekteyizdir (31). IDSA ve WHO antimikrobiyal direnci dünya çapında insan sağlığına yönelik en büyük üç tehditten biri olarak görmektedir (33). Düşük insidanslarına rağmen, *S. maltophilia* ve Bcc, özellikle

hastanede yatan ve immün sistemi baskılanmış hastalar için artan endişeleri temsil etmektedir. Özellikle bu bakteriler, birçok antibiyotiğe karşı doğal dirençlidir ve mevcut tedavileri sadece birkaç aktif antibiyotik ile sınırlıdır (34). Çoklu ilaç direncinin artması, yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine olan ilginin artmasına neden olmuştur. Patojenik türler hem eski hem de yeni antimikrobiyallere karşı koymak için çeşitli mekanizmalar geliştirmektedir (35). Direnci aşabilecek yeni bölgeleri hedefleyen yeni ajanlar üretme, bakteriyel enfeksiyonların uzun süreli kontrolü için kritik öneme sahiptir. Sıklıkla üzerinde çalışılan hedeflerden biri de bakteri zarıdır. Çoğu yapısal elemanın korunduğu ve membran hedefleyici antibiyotiklere karşı direncin, geçirgenlik bariyerini etkileyebilecek membran yapısında büyük değişiklikler gerektireceği için, bu çekici bir hedefdir. Bakteriyel zarı hedefleyen birçok madde, endojen AMP'ler dahil olmak üzere katyonik, yüzey amfifilik moleküllerdir. Tipik amfifilik bileşiklerin aksine, yüzey amfifilik moleküller ayrı hidrofilik ve hidrofobik yüzler gösterir. Amfifilik AMP'lere örnek olarak magaininler ve LL-37 verilebilir. Çoğu AMP'ler, geniş spektrumlu antibakteriyel etkiye sahip olup bakteri zarını hedef almaktadır. Bununla birlikte, birçok AMP'nin karmaşık yapı ve büyüklüğü nedeniyle sentezlenmesi ve saflaştırılması zordur (4). Ek olarak, AMP'ler, in vivo yarı ömürlerini sınırlayan proteazlar için substrat olabilir.

Bu tip enfeksiyonlarda tedavi süresi de önemli bir faktördür. Daha kısa tedavi kürleri enfeksiyonu yeterli şekilde tedavi etmek için yetersiz olabilir, ancak daha uzun antibiyotik kürleri ile artmış alerjik reaksiyonlar ve artmış toksisite riski (örn: aminoglikozitlerle ototoksisite ve nefrotoksisite) gözlenmektedir (65,66).

Bu nedenle çalışmamızda, henüz klinik kullanıma girmemiş olan katyonik steroid moleküllerden CSA-13, CSA-131 ve CSA-131-P'in tek başına ve levofloksasin, SXT ile kombinasyon halinde oluşturduğu etkilerin Bcc suşlarına karşı “zamana-bağlı öldürme” yöntemleri ile in vitro etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Literatürde yapılan kapsamlı araştırmalarda cerageninlerin Bcc enfeksiyonlarına karşı etkilerini inceleyen çalışma bulunamamıştır. Bu nedenle bu çalışma bir ilki oluşturmaktadır.

Literatürde CSA molekülleri ile yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır:

Yapılan çalışmalarda cerageninlerin çoğu geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahiptir. **CSA-13** gibi bu ajanların bazıları, benzer MİK ve MBK ile düşük konsantrasyonlarda bakterisittir. Savage ve ark. (67) ince filmler üretmek için CSA-13'ün

bir polimer omurgasına kovalent bağlanmasının bakteri üremesini engellediğini ve tıbbi cihazlarla ilişkili bakteriyel enfeksiyonların kontrol edilmesinde yardımcı olabileceğini saptamıştır. CSA-13, Gram negatif, fakültatif çomak, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium perfringens* gibi anaeroblar ve çoklu ilaç dirençli *Staphylococcus aureus* dahil olmak üzere Gram pozitif mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu aktivite göstermektedir. Cerageninlerin antibakteriyel aktivitesini daha iyi anlamak için, Chin ve ark. (68) CSA-8 ve CSA-13'ün aktivitelerini, vankomisin hetero dirençli ve dirençli *S. aureus*'un klinik izolatlarına karşı daptomisin, linezolid ve vankomisinin aktiviteleri ile karşılaştırmışlardır. CSA-13'ün MİK₅₀, MİK₉₀ ve MBK değerleri 1 µg/ml' dir. Genel olarak, CSA-13'ün MİK'leri ve MBK'ları, CSA-8'inkinden dört kat daha düşüktür. CSA-13'ün MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri vankomisin MİK' inden daha düşüktür ve CSA-13'ün MİK₉₀' ı linezolidinkinden daha düşüktür. Zamana-bağlı öldürme yönteminde 0.5xMİK' te bile CSA-13'ün bakterisidal etkili olduğu gösterilmiştir. Zamana-bağlı öldürme yöntemi ile yapılan çalışmalarda, CSA-13'ün tek başına kullanıldığında da güçlü bir ajan olduğunu göstermektedir.

CSA-13 ile *S. aureus*'a etkili sonuçlar elde eden Chin ve ark. (69) CSA-13'ün etkisini sefepim, meropenem, piperasilin / tazobaktam, tobramisin ve siprofloksasin ile duyarlılık testi ile ve sefepim, tobramisin ve siprofloksasin ile ise kombinasyon halindeki etkileşimlerini karşılaştırmıştır. CSA-13'ün MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 16 µg/ml' dir. Zamana- bağli öldürme yöntemi ile konsantrasyon bağımlı etki gösterip 4xMİK' te 1. saatte 3log azalma göstermiştir. CSA-13, sefepim ve siprofloksasin ile kombine halde kullanıldığında ise sinerjistik etki göstermiş, öte yandan tobramisin ile kombinasyonu iki suşta da herhangi bir değişiklik göstermemiştir.

Çalışmamızda ise 42 Bcc suşuna karşı CSA-13'ün mikrodilüsyon yöntemi ile saptanan MİK değerlerinin 2-128 µg/ml arasında, suşların % 50'sini ve % 90'ını inhibe eden konsantrasyonların ise sırasıyla 16 µg/ml ve 128 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Daha önce cerageninler ve Bcc ile yapılan çalışma olmadığından elde edilen bu bulgularımızı karşılaştırmak mümkün olmamıştır.

CSA-131 ise ikinci kuşak yani CSA-13 gibi ilk kuşak cerageninlerden daha sonra sentezlenen moleküllerdendir. CSA-131'in C12'de uzun hidrofobik zincire sahip olması aktivitesini arttırmaktadır. Hashemi ve ark. (70) kolistin dirençli *K. pneumoniae* suşları ile yaptıkları çalışmada antimikrobiyal madde olarak kolistin ve cerageninlerden CSA-

13, CSA-44, CSA-131, CSA-138 ve CSA-142'yi kullanmışlardır. *K. pneumoniae* 'nin dirençli suşları kolistin ile 16-200 µg/ml MİK verirken, cerageninlerin kolistin dirençli izolatlarının MİK değerlerinde sadece küçük değişiklikler gözlenmiştir. Çalışmada daha sonra *K. pneumoniae* 'nin kolistin duyarlı suşu ile birlikte diğer Gram negatif (*P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *A. baumannii* 'nin ATCC 19606) suşların dirençli olmasını sağlamak ve antimikrobiyal duyarlılığını izlemek için seri olarak kolistin ve CSA-131' e maruz bırakılmıştır. Yüksek derecede dirençli organizmaların ortaya çıkmasına neden olan kolistin seri maruziyeti, CSA-131'li MİK'lerde çok az değişikliğe sebep olmuştur veya hiç değişiklik yapmamıştır. Sonuç olarak önde gelen cerageninlerden CSA-44 ve kendi çalışmamızda da kullandığımız CSA-131 yüksek derecede kolistin dirençli bakterilere karşı bakterisidal aktiviteyi muhafaza etmiştir.

Villa-Farres ve ark. (71) bir önceki çalışmaya benzer şekilde kolistin duyarlı ve dirençli *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* klinik suşların cerageninlerle (CSA-138, CSA-13, CSA-131, CSA-44) in vitro antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. CSA-131 kolistin dirençli *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı en iyi aktiviteyi gösterirken, MİK değerleri sırasıyla 2 µg/ml ve <0.5 µg/ml olarak saptamıştır. Zamana-bağlı öldürme yönteminde ise sadece CSA-131 ile çalışma yapılmış ve konsantrasyona bağlı bakterisidal etki görülmekle birlikte düşük konsantrasyonlarda yeniden üreme gözlenmiştir. Sonuç olarak, araştırmacılar kolistin dirençli *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarının oluşturduğu enfeksiyonların tedavisi için CSA-131'in potansiyel seçenek olabileceğine dikkat çekmişlerdir.

Bozkurt-Güzel ve ark. (72)'nin 2020 yılında yayımlanan makalesinde ise karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşlarına karşı CSA-13, CSA-131, CSA-138, CSA-142 ve CSA-192'nin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. 20 adet karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşuna karşı MİK değerleri (µg/ml) CSA-13, CSA-131, CSA-138, CSA-142 ve CSA-192 için sırasıyla 4-16, 2-8, 4-32, 8-32, 0.5-2, 8-128 arasındadır. Araştırmacılar, CSA-13, CSA-131 ve CSA-138'in bu bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonların tedavisi için iyi birer aday olabilecekleri sonucuna varmışlardır.

Bozkurt-Güzel ve ark. (73)'nin 25 karbapenem dirençli *A. baumannii* suşu ile yaptığı araştırmada ise CSA-8, CSA-13, CSA-44, CSA-131, CSA-138'in tek başına ve kolistin ile kombinasyonunun sinerjistik aktiviteleri zamana-bağlı öldürme yöntemi ile araştırılmıştır. MİK₅₀ değerleri (µg/ml) CSA-8, CSA-13, CSA-44, CSA-131, CSA-138

ve kolistin için sırasıyla 32, 4, 8, 2, 4 ve 0.5' tir. MİK₉₀ (µg/ml) değerleri ise CSA-8, CSA-13, CSA-44, CSA-131, CSA-138 ve kolistin için sırasıyla 128, 8, 16, 8, 16 ve 16'dır. CSA-13, CSA-131 ve kolistin için seçilen dört suş ile zamana-bağılı öldürme yöntemi çalışılmıştır. 1xMİK ve 2xMİK CSA-13 konsantrasyonları eğri boyunca 6. saatte bakterisit etki göstermiştir. CSA-13+kolistin kombinasyonu 0.5xMİK ve 1xMİK 'te dört suştan ikisine ve 2xMİK' de dört suştan birine karşı sinerjistik aktivite göstermiştir. CSA-131+kolistin kombinasyonu 1xMİK' de dört suştan ikisine, 2xMİK' de dört suştan birine sinerjistik aktivite göstermiştir. CSA-13+CSA-131 kombinasyonu, 1xMİK' de dört suştan birine ve 2xMİK' de dört suştan ikisine karşı sinerjistik aktivite göstermiştir. Bu kombinasyon sonuçlarına göre, antibakteriyel ajanların konsantrasyona bağlı bir bakterisit etki sağladığı CSA-13, CSA-131 ve kolistin'i kombinasyon halinde kullanımının umut verici olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda ise 42 Bcc suşuna karşı CSA-131'in mikrodilüsyon yöntemi ile saptanan MİK değerlerinin 4-128 µg/ml arasında, suşların % 50'sini ve % 90'ını inhibe eden konsantrasyonların ise sırasıyla 16 µg/ml ve 64 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Daha önce cerageninler ve Bcc ile yapılan çalışma olmadığından elde edilen bu bulgularımızı karşılaştırmak mümkün olmamıştır.

Cerageninler sadece bakteri duvarı ile etkileşimde bulunmaz ayrıca yüksek konsantrasyonlarda ökaryotik hücrelerin plazma membranlarını permeabilize edebilmektedir. Bu toksik etkiler klinik kullanımlarını sınırlamaktadır. İlaç taşıyıcısı olarak çeşitli poloksamerler geliştirilmektedir. Çalışmamızda "pluronik" olarak adlandıracağımız, **poloksamer Pluronic® F127** kullanılmıştır. Pluronic® F127 iyonik olmayan yüzey aktif bir maddedir. Spesifik dokulara ilaç taşınması ve iyi tanımlanmış misel form oluşturması özellikleriyle nedeniyle çalışmamızda CSA-131 ile birlikte kullanılmıştır. 2012 yılında Nagant ve ark. (74) yaptığı çalışmada pluronik asidin, yüksek ilaç konsantrasyonlarında ökaryotik hücreleri mitokondriyal yıkımdan koruduğu ve CSA-13'ün toksisitesini azalttığı sonucuna ulaşmışlardır. Leszczyńska ve ark. (75) yaptığı çalışmada CSA-13'ün pluronik asit varlığında (CSA-13-P) ilaca maruz kalmış eritrositlerde hemolitik etkisini önlediği bildirilmiştir. Hashemi ve ark. (59) CSA-131 ve onun poloksamer pluronik formu olan CSA-131-P ile *S. aureus* ve Bcc'ye yakın bir tür olan *P. aeruginosa* ile yaptığı çalışmada CSA-131 ve CSA-131-P' nin MİK sonuçları aynı olup her iki suş için MİK değerleri sırasıyla 1 ve 2 µg/ml bulmuşlardır.

Cerageninlerin amfifilik doğası pluronik misellerle iyi bir şekilde bağ kurmasını sağlamaktadır. Pluronik form ile daha önce yapılan çalışmalarda antibakteriyel aktiviteyi önemli ölçüde etkilemediği saptanmıştır. Bununla birlikte yapılan *ex-vivo* bir deneyde trakea üzerindeki biyofilmleri ortadan kaldırmak için gerekli olan CSA-131 konsantrasyonları silya hasarına neden olmaktadır. Kirpikler üzerindeki bu etkileri hafifletmek için CSA-131-pluronik formu, CSA-131'in antimikrobiyal aktivitesini değiştirmemekle birlikte, CSA-131'in kirpikler üzerindeki olumsuz etkisini ortadan kaldırmıştır. AMP'lerden esinlenen bir grup olarak sentezlenen ve pluroniklerin koruyucu etkisine sahip olan ceragenin CSA-131-pluronik, polimikrobiyal ve biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisi için uygun aday molekül olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda ise 42 Bcc suşuna karşı CSA-131-Pluronik (CSA-131-P)'nin mikrodilüsyon yöntemi ile saptanan MİK değerlerinin 2-128 µg/ml arasında, suşların % 50'sini ve % 90'ını inhibe eden konsantrasyonların ise sırasıyla 16 µg/ml ve 128 µg/ml olduğu belirlenmiştir.

Abbott ve ark. (76) nın yaptıkları çalışmada, E-test yöntemi ile belirlediği MİK değerlerinden % 67.9 duyarlılıkla en aktif bulduğu antimikrobiyal madde SXT olmuştur. Peeters ve ark. (77) ise seftazidim, siprofloksasin, meropenem, minosiklin, tobramisin ve SXT'in Bcc suşlarına karşı aktivitelerini araştırdığı çalışmada siprofloksasin, tobramisin ve SXT'in MİK değerlerinin (µg/ml) geniş bir aralıkta değiştiğini, sırasıyla <0.25-128, 2-1024, 0.25/4.75-128/2432 saptamışlardır. Çalışmamızda ise 42 Bcc suşuna karşı SXT değeri 0,12/3,75- > 4/76 arasında değişiklik göstermiştir. Van Dalem ve ark. (82) nın 91 adet Bcc suşunun seftazidim-avibaktam, seftazolon- tazobaktam ve 13 farklı antibiyotik ile yaptıkları duyarlılık çalışmalarında en yüksek duyarlılık % 82 oranında SXT ile bulunmuştur. Livermore ve ark. (79) yaptığı çalışmada ise Bcc suşları % 75 oranında SXT duyarlılığı saptamışlardır. Çalışmamızda ise 42 Bcc suşuna karşı SXT duyarlılığı % 71.42' dir. Bu çalışmada, levofloksasin ve SXT' nin CSA-13, CSA-131 ve CSA-131-P ile olan kombinasyonlarının oluşturdukları etkiler zamana-bağlı öldürme yöntemi ile beş adet Bcc suşuna karşı araştırılmış ve zamana-bağlı öldürme eğrileri çizilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5). Ayrıca zamana-bağlı öldürme eğrilerine ait toplu bulgular Tablo 4.5'de ifade edilmiştir.

Zamana-bağlı öldürme deneyinde, kullanılan antimikrobiyal maddelerden 24 saatin sonunda 1xMİK'de bakterisidal etki görülmemekle birlikte, erken saatte (2., 4., ve

6. saatlerde) CSA-13, CSA-131 ve CSA-131-P'de bakterisidal etki gözlenmiştir. 4xMİK'de ise CSA-131-P erken saatlerde çalışılan beş suşun tamamında bakterisidal etki saptanmıştır.

1xMiK CSA-13+ 1xMİK levofloksasin kombinasyonlarında, çalışılan beş suşun dördünde sinerjist etki saptanırken, aynı kombinasyonda erken sinerjizm 2. saatte iki suşta gözlenmekle birlikte 4. ve 6. saatte tüm suşlarda sinerjizm gözlenmiştir. 4xMİK CSA-131-P+ 4xMİK levofloksasin kombinasyonlarında çalışılan beş suşun dördünde sinerjist etki saptanmıştır. 4xMİK CSA-13+4xMİK levofloksasin ve 4xMİK CSA-13+4xMİK SXT kombinasyonlarında beş suşun beşinde sinerjist etki saptanmıştır. **4xMİK CSA-131+ 4xMİK levofloksasin** kombinasyonlarında çalışılan beş suşun üçünde sinerjist etki gözlenirken, 4. ve 6. saatte çalışılan beş suşun tamamında sinerjizm gözlenmiştir. **1xMİK CSA-131-P+ 1xMİK levofloksasin** kombinasyonlarında, çalışılan beş suşun birinde sinerjist etki gözlenirken, 6. saatte çalışılan beş suşun birinde aditif etki görülmüştür. Zamana-bağlı öldürme deneyileri, Bcc suşlarına karşı cerageninlerin zaman ve konsantrasyona bağlı aktivitelerini göstermiştir. Beklendiği gibi, konsantrasyonlar arttıkça tüm cerageninlerin daha kısa sürede etkili olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, Bcc'nin neden olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde henüz klinik kullanıma girmemiş olan cerageninlerin, özellikle CSA-13, CSA-131 ve CSA-131-P, uygun antibiyotikler ve kombinasyonları seçilerek kullanım konsantrasyonları, aktiviteleri ve süreleri konusunda klinisyenlere ışık tutan bulgularımızın, gerekli araştırmalar yapıldıktan sonra Bcc enfeksiyonlarının tedavisine yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Altay ÖH. Burkholderia Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Tiplendirilmesi, Türler Arasında Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotik Direnç Farklılığının Belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi. Ankara. 2019.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-sixth edition M100S, Wayne PA, USA.
3. Lai XZ, Feng Y, Pollard J, Chin JN, Rybak MJ, Burcki R ve ark. Ceragenins: cholic acid- based mimics of antimicrobial peptides. *Acc Chem Res* 2008; **41** (10): 1233- 1240.
4. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 1992; **56**: 395-411.
5. Li C, Budge LP, Driscoll CD, Willardson BM, Allman GW, Savage PB. Incremental conversion of outer-membrane permeabilizers into potent antibiotics for Gram-negative bacteria. *J Am Chem Soc* 1999; **121** (5): 931-940.
6. Schmidt EJ, Boswell JS, Walsh JP, Schellenberg MM, Winter TW, Li C ve ark. Activities of cholic acid-derived antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria. *J Antimicrobial Chem* 2001; **47** (5): 671-674.
7. Peterson N, editor. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Baltimore MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
8. Sfeir MM. *Burkholderia cepacia* complex infections: More complex than the bacterium name suggest. *J Infect* 2018; **77**(3): 166- 170.
9. Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P ve ark. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *The Journal of pediatrics* 1984; **104**(2): 206-210.
10. CDC. USA: *Burkholderia cepacia* in Healthcare Settings (İnternette) 2010, 24 Kasım. Erişim 01.03.2020, <https://www.cdc.gov/HAI/organisms/bCepacia.html>.

11. CF FOUNDATION: Patient Registry 2017 Annual Report (İnternette) 2017, Erişim 01.05.2020, www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf.
12. CF TRUST: UK Cystic Fibrosis Trust. UK CF Annual Report (İnternette) 2018, Erişim 01.05.2020, www.cysticfibrosis.org.uk.
13. CDC. USA: *Multistate Outbreak of Burkholderia cepacia Bloodstream Infections Associated with Contaminated Prefilled Saline Flush Syringes* (İnternette) 2017, 19 Nisan. Erişim 01.03.2020, <https://www.cdc.gov/hai/outbreaks/b-cepacia-saline-flush/index.html>.
14. CDC. USA: *Multistate Outbreak of Burkholderia cepacia Infections Associated with Oral Liquid Docusate Sodium* (İnternette) 2017, 25 Ağustos. Erişim 01.03.2020, <https://www.cdc.gov/hai/outbreaks/b-cepacia/index.html>.
15. Koruk ST, Bayraktar M, Koruk İ, Yılmaz L. Üriner sistoskop kontaminasyonu sonrası gelişen hastane kaynaklı *Burkholderia cepacia* salgını. *ANKEM Derg* 2010; **24**(4), 193.
16. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud- Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 2010; **8** (4): 251-259.
17. Devanga Ragupathi NK, Veeraraghavan B. Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update: *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2019; **18**(1): 7.
18. Burkholder WH. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 1950; **40** (1): 115-117.
19. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hatto H, Hashimoto Y ve ark. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Pallerioni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* 1992; **36** (12): 1251-1275.
20. Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R ve ark. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic

- fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997; **47** (1): 188-200.
21. Vermis K, Coenye T, Mahenthiralingam E, Nelis H, Vandamme P. Evaluation of species specific recA- based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. *J Med Microbiol* 2002; **51** (11): 937-940.
 22. Martina P, Leguizamon M, Prieto CI, Sousa SA, Montanaro P, Draghi WO ve ark. *Burkholderia puraquae* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018; **68** (1), 14-20.
 23. Ong KS, Aw YK, Lee LH, Yule CM, Cheow YL, Lee SM. *Burkholderia paludis* sp. nov., an antibiotic-siderophore producing novel *Burkholderia cepacia* complex species, isolated from Malaysian tropical peat swamp soil. *Front Microbiol* 2016; **7**, 2046.
 24. Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ ve ark. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009; **59** (1), 102-111.
 25. Jin Y, Zhou J, Hu M, Zhang Q, Kong N, Yue J. Genome-based classification of *Burkholderia cepacia* complex provides new insight into its taxonomic status. *Biol Direct* 2020; **15** (1), 1-14.
 26. Segonds C, Heulin T, Marty N, Chabanon G. Differentiation of *Burkholderia* Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the 16S rRNA Gene and Application to Cystic Fibrosis Isolates. *J Clin Microbiol* 1999; **37** (7): 2201-2208.
 27. Coenye T, LiPuma JJ, Henrt D, Hoste B, Vandemeulebroucke K, Gillis M ve ark. *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Med Microbiol* 2002; **51** (11): 937-940.
 28. Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y ve ark. DNA- based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia*

- multivorans*, *Burkholderia stabilis* and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 3165-3173.
29. NCBI: Taxonomy Browser (İnternette) 2020. Erişim 01.03.2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Burkholderi+cepacia+complex>.
30. Vandamme P, Dawynd P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, Present and Future. *Syt Appl Microbiol* 2011; **34**(2): 87-95.
31. CDC, USA: Antibiotic Resistance Threats in the United States (İnternette) 2013. Erişim 01.03.2020, <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
32. O'Neill J. Tackling Drug- Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. [web page on the internet] (2016). 01.03.2020. *The Review on Antimicrobial Resistance*: <https://amr-review.org>.
33. Spellberg B, Blaser M, Guidos RJ, Boucher H, Bradley J, Eisenstein B ve ark. Combating antimicrobiol resistance: policy recommendations to save lives. *Clin Infect Dis* 2011; **52**: 397- 428.
34. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG ve ark. Multidrug- resistant extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18** (3): 268-281.
35. Rhodes KA, Schweizer HP. Antibiotic Resistance in *Burkholderia* Species. *Drug Resist Updat* 2016; **28**: 82-90.
36. Hwang J, Kim HS. Cell Wall Recycling- Linked Coregulation of AmpC and PenB beta- lactamases through ampD Mutations in *Burkholderia cenocepacia*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 7602- 7610.
37. Aygöl A. Antibiyotik direncinde dışa atım sistemlerinin ve dirençle mücadelede dışa atım pompa inhibitörlerinin önemi. *Mikrobiyol Bul* 2015; 278- 291.

38. Bazzini S, Udine C, Sass A, Pasca MR, Longo F, Emiliani G ve ark. Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*. *PLoS One* 2011; **6**: 18902.
39. Buroni S, Matthijs N, Spadaro F, Van Acker H, Scoffone VC, Pasca MR ve ark. Differential roles of RND efflux pumps in antimicrobial drug resistance of sessile and planktonic *Burkholderia cenocepacia* cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58** (12): 7424-7429.
40. Tseng SP, Tsai WC, Liang CY, Lin YS, Huang JW, Chang CY ve ark. The contribution of antibiotic resistance mechanisms in clinical *Burkholderia cepacia* complex isolates: an emphasis on efflux pump activity. *PLoS One* 2014; **9** (8): e104986.
41. Jassem AN, Forbes CM, Speert DP. Investigation of aminoglycoside resistance inducing conditions and a putative AmrAB-OprM efflux system in *Burkholderia vietnamiensis*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; **13** (1): 2.
42. Fehlner-Gardiner CC, Valvano MA. Cloning and characterization of the *Burkholderia vietnamiensis* norM gene encoding a multi-drug efflux protein. *FEMS Microbiol Lett* 2002; **215** (2): 279-283.
43. Loutet SA, Valvano MA. Extreme antimicrobial peptide and polymyxin B resistance in the genus *Burkholderia*. *Front Microbiol* 2011; **1**: 159.
44. Malott RJ, Wu CH, Lee TD, Hird TJ, Dalleska NF, Zlosnik JE ve ark. (2014). Fosmidomycin decreases membrane hopanoids and potentiates the effects of colistin on *Burkholderia multivorans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58** (9): 5211-5219.
45. Pope CF, Gillespie SH, Pratten JR, McHugh TD (2008). Fluoroquinolone-resistant mutants of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52** (3): 1201-1203.
46. Holden MT, Seth-Smith HM, Crossman LC, Sebaihia M, Bentley SD, Cerdeno- Tarraga AM ve ark. The genome of *Burkholderia cenocepacia* j2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J Bacteriol* 2009; **191**: 261- 277.

47. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement M100-S24, Wayne PA, USA
48. Avgeri SG, Matthaiou DK, Dimopoulus G, Grammatikos AP, Falagas ME. Therapeutic options for *Burkholderia cepacia* infections beyond cotrimoxazole: a systematic review of the clinical evidence. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **33** (5): 394-404.
49. Mushtaq S, Warner M, Livermore DM. In vitro activity of ceftazidime+ NXL104 against *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermenters. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65** (11): 2376-2381.
50. El Chakhtoura NG, Saade E, Iovleva A, Yasmin M, Wilson B, Perez F. Therapies for multidrug resistant and extensively drug-resistant non-fermenting gram-negative bacteria causing nosocomial infections: a perilous journey toward 'molecularly targeted' therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2018; **16** (2): 89-110.
51. Papp-Wallace KM, Becka SA, Zeiser ET, Ohuchi N, Mojica MF, Gatta JA et al. Overcoming an extremely drug resistant (XDR) pathogen: avibactam restores susceptibility to ceftazidime for *Burkholderia cepacia* complex isolates from cystic fibrosis patients. *ACS Infect Dis* 2017; **3** (7): 502-511.
52. Mazer DM, Young C, Kalikin LM, Spilker T, LiPuma JJ. In vitro activity of ceftolozane-tazobactam and other antimicrobial agents against *Burkholderia cepacia* complex and *Burkholderia gladioli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61** (9): e0076-17.
53. Hackel MA, Tsuji M, Yamano Y, Echols R, Karlowsky JA, Sahm DF. In vitro activity of the siderophore cephalosporin, cefiderocol, against a recent collection of clinically relevant Gram-negative bacilli from North America and Europe, including carbapenem-nonsusceptible isolates (SIDERO-WT-2014 Study). *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61** (9): e00093-17.
54. Savage PB, Li C, Taotafa U, Ding B, Guan Q. Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 2002; **217** (1): 1-7.
55. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**: 491- 511.

56. Cheng Y, Ho D, Gottlieb CR, Kahne D, Bruck MA. Facial amphiphiles. *J Am Chem Soc* 1992; **114**: 7319- 7920.
57. Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic R- helical antimicrob peptides. *Biopolymers* 1998; **47**: 451- 463.
58. Pitto-Barry A, Barry NP. Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. *Polym Chem* 2014; **5**(10): 3291-3297.
59. Hashemi MM, Holden BS, Taylor MF, Wilson J, Coburn J, Hilton B ve ark. Antibacterial and antifungal activities of poloxamer micelles containing ceragenin CSA-131 on ciliated tissues. *Molecules* 2018; **23** (3): 596.
60. Khandelia H, Ipsen JH, Mouritsen OG. The impact of peptides on lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1778**: 1528- 1536.
61. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining an bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved Guideline M26-A NCCLS, Wayne; 2002.
62. KİFDER: Aile Rehberi (İnternette) Erişim 01.05.2020, http://www.kifder.org.tr/indir/Kifder_Aile_Rehberi.pdf.
63. Regan KH, Bhatt J. Eradication therapy for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database of Syst Rev* 2019; **4**(4): CS009876.
64. The National Institute for Health and Care Excellence. Cystic fibrosis: diagnosis and management (NICE guidelines) www.nice.org.uk/guidance/ng78
65. Parmar JS, Nasser S. Antibiotic allergy in cystic fibrosis. *Thorax* 2005; **60**(6): 517-520.
66. Prayle A, Smyth AR. Aminoglycoside use in cystic fibrosis: therapeutic strategies and toxicity. *Curr Opin Pulm Med* 2010; **16**(6):604-610.
67. Savage PB, Michaelis D, Orsak T, Nielson J, Genberg C. Thin film containing a cationic steroid antibiotic displays bactericidal activity. *In Abst 45th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother* 2005; pp. F-1235.
68. Chin JN, Rybak MJ, Cheung CM, Savage PB. Antimicrobial activities of ceragenins against clinical isolate of resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51** (4): 1268-1273.

69. Chin JN, Jones RN, Sader HS, Savage PB, Rybak MJ. Potential synergy activity of the novel ceragenin, CSA-13, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, including multidrug-resistant *P. aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61** (2): 365-370.
70. Hashemi MM, Rovig J, Weber S, Hilton B, Forouzan MM, Savage PB. Susceptibility of colistin-resistant, Gram-negative bacteria to antimicrobial peptides and ceragenins. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61** (8):e00292-17.
71. Vila-Farrés X, Callarisa AE, Gu X, Savage PB, Giralt E, Vila J. CSA-131, a ceragenin active against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **46** (5): 568-571.
72. Bozkurt- Güzel Ç, Avci NM, Savage PB. In vitro activities of the cationic steroid antibiotics CSA-13, CSA-131, CSA-138, CSA-142, and CSA-192 against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Turk J Pharm Sci* 2020; **17** (1): 63-67.
73. Bozkurt- Güzel Ç, Inci G, Oyadı, Savage PB. Synergistic activity of ceragenins against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in both checkerboard and dynamic time-kill assays. *Curr Microbiol* 2020; **77**(8): 1419-1428.
74. Nagant C, Savage PB, Dehaye JP. Effects of pluronic acid F-127 on the toxicity towards eukaryotic cells of CSA-13, a cationic steroid analogue of antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol* 2012; **112** (6):1173-1183.
75. Leszczyńska K, Namiot A, Cruz K, Byfield FJ, Won E, Mendez G, Sokolowski W ve ark. Potential of ceragenin CSA-13 and its mixture with pluronic F-127 as treatment of topical bacterial infections. *J Appl Microbiol* 2011; **110** (1): 229-238.
76. Abbott FK, Milne KEN, Stead DA, Gould IM. Combination antimicrobial susceptibility testing of *Burkholderia cepacia* complex: significance of species. *Int J Antimicrob Agents* 2016; **48** (5): 521- 527.
77. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. In vitro activity of cetazidime, ciprofloxacin, meropenem, minocycline, tobramycin and trimethoprim/sulfamethoxazole

- against planktonic and sessile *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64** (4): 801-809.
78. Van Dalem A, Herpol M, Echahidi F, Peeters C, Wybo I, De Wachter E et al. In vitro susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients to ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62** (9): e00590-18.
79. Livermore DM, Mushtag S, Warner M, Woodford N. Comparative in vitro activity of sulfamethoxazole/trimethoprim and sulfamethoxazole/trimethoprim and other agents against multiresistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69** (4): 1050-1056.



ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 12

Konu: Doç. Dr. Çağla Bozkurt GÜZEL hk.

Tarih : 06.01.2020

Sayın Doç. Dr. Çağla Bozkurt GÜZEL
Eczacılık Fakültesi

İlgi : Eczacılık Fakültesinin 22/11/2019 tarihli yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Uzm. Ecz. Elif Sena DEMİR' in yürüteceği 2019/1443 dosya numaralı "Katyonik Steroid Antibiyotiklerin Burkholderia Cepacia Kompleks Suşlarına Karşı Oluşturduğu İn vitro Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması" başlıklı çalışma, kurulumuzun 20/12/2019 tarih ve 21 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KATYONİK STERÖİD ANTİBİYOTİKLERİN BURKHOLDERİA
CEPACİA KOMPLEKS SUŞLARINA KARŞI OLUŞTURDUĞU İN
VİTRO ETKİLERİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 15	% 5	% 2	% 13
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 10
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	cms.galenos.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.ankemdernegi.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.dovepress.com İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Elif Sena	Soyadı	Demir
Doğ.Yeri	Maltepe	Doğ.Tar.	07/06/1995
Email	elifsenademir@gmail.com	Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2018
Lise	Haydarpaşa Lisesi	2013

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Kalite Güvence Uzmanı	Sandoz Sağlık	2018-2019
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		YDS-70

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office (Word, Excel, Power Point)	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri : ECCMID 2020 Paper Poster Presentation

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Koşu, yoga, CrossFit, kitap okuma, gastronomi