

# KİSTİK FİBROZİSTE MİKROBİYOLOJİ

## ÖNEMLİ NOKTALAR

- KF'te solunum yollarında kolonizasyona ve enfeksiyona en sık yol açan mikroorganizmalar *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* kompleksidir.
- İkinci derecede öneme sahip olanlar ise solunum sinsityal virus, influenza virus ve *Aspergillus fumigatus*'tur.
- Non-tüberküloz mikobakteriler, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Achromobacter xylosoxidans* KF'te son yıllarda gittikçe artan sıklıkta izole edilmektedir, ancak patojenik rolleri henüz kesinlik kazanmamıştır.
- *P. aeruginosa* KF'te solunum yollarında hastalığa yol açan en önemli patojendir. İlk izole edilen *P. aeruginosa* suşları nonmukoid koloni tipinde olup, pek çok antibiyotiğe duyarlıdır. Zaman içinde olguların çoğu "mukoid" fenotipte *P. aeruginosa* suşları ile kronik enfeksiyon geliştirirler. Mukoid suşun saptanması enfeksiyonun kronikleştiğinin en önemli göstergesidir.
- KF'teki balgamın yoğun viskoz yapısı, polimikrobiyal üremeler ve bazı bakterilerin yavaş üreme hızı göstermeleri nedeniyle kültürlerin değerlendirilmesi oldukça güçtür ve deneyim gerektirmektedir.
- Kullanımda olan ticari otomatize sistemlerin çoğu KF patojenlerini doğru tanımlamada ve antibiyotik duyarlılık sonuçlarını saptamada yetersiz kalmaktadır.
- KF'te sekresyonlar sıklıkla viskoz olduğundan örneklerin uygun bir yöntemle çözünmesi gerekmektedir. Bu amaçla balgam dithiothreitol veya DNase gibi mukolitik ajanlar ile muamele edildikten sonra sulandırılmalı ve kantitatif kültür yapılmalıdır.
- Polimikrobiyal kolonizasyon/enfeksiyon, KF için karakteristik olduğundan örnekte bulunan her mikroorganizmanın ayrı ayrı izole edilmesi ve tanımlanması gerekmektedir.
- Mukoid *P. aeruginosa* kültür plaklarında sıklıkla diğer gram negatif ve pozitif bakterileri kapatarak izolasyonlarını zorlaştırdığı için KF solunum yolu örneklerinin mikrobiyolojik değerlendirmesi için seçici besiyerlerinin kullanılması gerekmektedir.

Solunum yolu enfeksiyonları kistik fibrozis (KF) olgularında morbidite ve mortaliteden en sık sorumlu olan klinik durum olarak kabul edilmektedir. KF'te görülen solunum yolu enfeksiyonları sıklıkla polimikrobiyal özellikte olup, tedavi ile eradikasyon her zaman mümkün olmamaktadır. KF'te solunum yollarında kolonizasyona ve enfeksiyona en sık yol açan ve esas önemli olan mikroorganizmalar *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* kompleks olup, ikinci derecede öneme sahip olanlar ise solunum sinsityal virus, influenza virus ve *Aspergillus fumigatus* olarak sıralanabilir. Non-tüberküloz mikobakteriler (NTM), *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Achromobacter xylosoxidans* bu olgularda son yıllarda gittikçe artan sıklıkta izole edilmekle birlikte, bu mikroorganizmaların patojenik rolleri henüz kesinlik kazanmamıştır [1-5].

KF'te mikrobiyal ekolojiye bakıldığında üç nokta dikkati çekmektedir. Birinci nokta KF'te farklı türde bakteri, veya bakteri, virus ve mantarların sıklıkla koenfeksiyon yapması; ikinci nokta ise koenfeksiyon yapan bu türlerin birbirlerine karşı sinerjistik ve/veya antagonistik özellikte olmasıdır. Dikkati çeken son nokta ise bu patojenlerin KF akciğerlerinde ortaya çıkan seçici baskı ortamında evrimleşmeleri ve bu nedenle bazı farklılık ve avantajlar kazanmalarıdır [6]. Koenfeksiyon aynı tür bakterinin tamamen farklı fenotip ve genotipteki suşları ile de gerçekleşebilmektedir. Yapılan araştırmalar bir KF balgam örneğinde farklı fenotipte *P. aeruginosa* izolasyonunun bir ile altı arasında değiştiğini göstermektedir [6]. Kronik enfeksiyon ortamında gerçekleşen evrimleşme sırasında bakteri doğal olarak genetik değişikliklere uğrayabilmektedir. Bu genetik değişiklikler bakterinin antibiyotiklere ve konağın savunma mekanizmalarına direnç göstermesini sağlayarak bakterinin yaşam şansını arttırmakta ve enfeksiyonun kalıcılığına neden olmaktadır.

Farklı mikroorganizmalar arasındaki etkileşim sinerjistik veya antagonistik özellikte olabilmektedir. KF mikrobiyolojisinde uzun süredir kabul gören bir gerçek hastalığın erken dönemlerinde gelişen *S. aureus* kolonizasyonu/enfeksiyonunun solunum yollarını *P. aeruginosa*'ya duyarlı hale getirmesidir. Benzer bir ilişki solunum sinsityal virus ve *P. aeruginosa* arasında da gösterilmiştir. Mukoid *P. aeruginosa* ile kronik kolonizasyonun *S. maltophilia*, *A. xylosoxi-*

*dans* ve *Mycobacterium abscessus* gibi nadir görülen bakterilerle enfeksiyonu kolaylaştırdığı da öne sürülmektedir [2,6]. Antagonistik ilişkiye en güzel örnek ise yine *S. aureus*-*P. aeruginosa* arasında görülen kompetitif ilişkidir. *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve diğer gram pozitif bakterileri parçalayarak açığa çıkan demiri kendi üremesi için kullanmaktadır.

## KF'TE KOLONİZASYON VE ENFEKSİYONA YOL AÇAN MİKROORGANİZMALAR

### *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* KF'te solunum yollarında hastalığa yol açan en önemli patojendir. *P. aeruginosa*'nın alt solunum yollarına yerleşmesi artan morbidite ve mortalite ile ilişkilendirilmektedir. İlk izole edilen *P. aeruginosa* suşları nonmukoid koloni tipinde olup, pek çok antibiyotiğe duyarlıdır. Bazı araştırmacılar bu devrede yoğun bir antimikrobiyal tedavi ile eradikasyonun sağlandığını ileri sürmektedirler [5]. Ancak zaman içinde olguların çoğu "mukoid" fenotipte *P. aeruginosa* suşları ile kronik enfeksiyon geliştirmektedirler. Mukoid suşun saptanması enfeksiyonun kronikleştiğinin en önemli göstergesidir. Mukoid suşlar solunum yolunda, bir tür ekzopolisakkarit olan aljinattan zengin biyofilmler şeklinde yaşamaktadırlar. KF hastalarında solunum yollarında gelişen enflamatuvar yanıt sırasında oluşan oksijen radikallerinin bakteri genomunda mutasyonlara yol açarak aljinat sentezini indüklediği gösterilmiştir. Bakteriler ortam koşullarına bağlı olarak moleküler organizasyonlarını değiştirebilmekte ve böylelikle farklı patojenite seçeneklerine sahip olma yeteneği kazanmaktadır. Bu durum bakteri açısından çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Biyofilmi oluşturan hücreler ekzopolisakkarit matriks sayesinde ortamdaki besin maddelerini kolaylıkla yakalayıp yoğunlaştırırlar. Biyofilm içinde üreme sayesinde *P. aeruginosa* hem antibiyotiklerin etkisinden hem de akciğerlerdeki immün yanıtın korumaktadır [7-9].

KF hastalarında kolonize olan *P. aeruginosa* suşları erken yaşlarda genetik heterojenite gösterirken zamanla solunum yollarına yerleşen *P. aeruginosa* genotipinin değişmediği, hastalığın stabil olduğu ve alevlenme gösterdiği dönemlerde aynı genotipi gösteren suşun izole edildiği izlenmektedir [9].

KF hastalarında *P. aeruginosa* kolonizasyonunun eradikasyonunda kritik nokta bakteri izolasyonunun bakteri solunum yollarına ilk yerleştiği zaman yapılabilmesidir. Bilindiği gibi bu dönemde *P. aeruginosa* genellikle nonmukoid özellikte olup, antibiyotiklere duyarlıdır [5,10]. Enfeksiyon kronikleştikçe *P. aeruginosa* suşları bazı fenotipik değişimlere uğradıklarından mikrobiyolojik tanılarındaki da güçlük yaşanmaktadır. Aynı zorluk antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumunda da görülmektedir [11,12].

*P. aeruginosa*'yı kültürde saptamanın güçlüğü ve bazı durumlarda saptamada geç kalma anti-*Pseudomonas* antikorlarının tanındaki yerini gündeme getirmiştir. Çeşitli

prospektif çalışmalar serolojik yöntemlerle antikor saptanmasının kültür pozitifliğinden önce gerçekleşebileceğini ve *P. aeruginosa* kolonizasyonunu erken belirleme açısından tanılabilirliği olduğunu ileri sürmektedirler [13-15]. *P. aeruginosa*'ya ait virulans faktörlerinden ekzotoksin A, elastaz, fosfolipaz C ve proteaza karşı saptanan antikor titreleri erken anti-pseudomonal tedaviye olanak sağlayarak hastalık prognozunu olumlu yönde etkileyebilmektedir. Ratjen ve ark. anti-pseudomonal antikorların tedavi izleminde de faydalı olduğunu, başarılı bir tedavi sonunda antikor titresinin anlamlı ölçüde düştüğünü vurgulamaktadırlar [15].

### *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* 10 yaşını geçen KF olgularının yaklaşık %50'sinde saptanan bir bakteridir. *S. aureus* sıklıkla KF olgularında solunum yolu örneklerinden ilk izole edilen patojendir [4, 16]. *S. aureus*'a bağlı morbidite ve mortalite yüksek olmamakla birlikte solunum yollarında *S. aureus*'a bağlı gelişen hasarın *P. aeruginosa* ile kolonizasyonu kolaylaştırdığı ileri sürülmektedir. Bu nedenle KF olgularında *S. aureus* eradikasyonu önerilmektedir. *S. aureus* nazal taşıyıcılığı KF olgularında daha yüksektir [17]. *S. aureus* hastadan hastaya veya aile üyeleri arasında sıklıkla geçiş gösterebilmekte ve aynı suş ile uzun süreli kolonizasyon ve/veya enfeksiyon gelişebilmektedir [17].

KF olgularından izole edilen *S. aureus* suşlarının bir özelliği okzotrofik formların sık görülebilmesidir. Bu okzotrofik formlar daha önceden "timidin bağımlı izolatlar" olarak tanımlanırken günümüzde "küçük koloni varyantları (KKV)" olarak isimlendirilmektedirler. KKV mikrobiyolojik besiyerlerinde yavaş üreyen, tipik *S. aureus* morfolojisi göstermeyen ve normal *S. aureus* suşlarına göre antibiyotiklere daha yüksek oranlarda direnç gösteren türlerdir. KKV, *S. aureus*'un KF solunum yollarında kalıcılığı ile ilişkilendirilmektedir. KKV'nın daha çok hücre içi yerleşim göstermeleri, konak savunma mekanizmalarına daha dirençli olmalarına neden olmaktadır [18,19]. *S. aureus* KKV'nın, KF hastalığında görülme oranının yüksek olduğu saptanmıştır. KF hastalarında *S. aureus* prevalansını inceleyen prospektif bir çalışmada hastaların %72.2'sinin *S. aureus* ile enfekte olduğu, bunların %46'sında *S. aureus* KKV bulunduğu belirlenmiştir [20]. *S. aureus* KKV kronik *P. aeruginosa* kolonizasyonu olan olgularda daha sık görülmektedir. Bu durum hem *P. aeruginosa* tarafından salgılanan 4-hidroksi 2-heptilkinolin-N-oksit maddesine hem de biyofilm ortamında *S. aureus*'un ortama daha kolay uyum sağlayan KKV formuna dönüşme mekanizmasına bağlanmaktadır [21]. *S. aureus* KKV hem antibiyotik direnci hem de solunum yolu enfeksiyonunun kalıcılığı açısından önem taşıdığından KF hastalarının solunum yolu örneklerinde dikkatle değerlendirilmeli ve rapor edilmelidir.

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları ile kolonizasyon ve enfeksiyon oranı tüm topluluklarda arttığı gibi KF popülasyonunda da artış göstermektedir. Bu oran farklı merkezlerde %0-23 arasında değişmektedir [19].

KF'te kronik MRSA enfeksiyonu ciddi bronşektazi ile ilişkilendirilse de MRSA enfeksiyonu ile akciğer fonksiyonlarının kötüleşmesi arasındaki ilişkiye yönelik sonuçlar çelişkilidir. Kronik MRSA enfeksiyonunun solunum fonksiyonlarını bozduğu ve daha yoğun bir tedavi gerektirdiği saptanmakla birlikte geçici MRSA kolonizasyonunun akciğer fonksiyonları üzerine belirgin bir etkisi olmadığı ileri sürülmektedir [22]. Miall ve ark. MRSA enfeksiyonunun solunum fonksiyonları üzerine belirgin bir etkisi olmadığını ancak KF'li çocuklarda büyüme üzerine negatif etkisi olduğunu öne sürmektedirler [23]. MRSA ile kolonize pek çok KF olgusunun *P. aeruginosa*, *B. cepacia* kompleks ve diğer bakterilerle de kolonize/enfekte olduğu göz önüne alınırsa, MRSA'nın KF'teki klinik önemini kesin olarak açığa çıkarmak her zaman olası değildir.

### ***Haemophilus influenzae***

*H. influenzae* özellikle çocuk KF olgularında üçüncü sıklıkta izole edilen patojen olup erişkin olgularda nadiren saptanmaktadır. KF olgularından izole edilen *H. influenzae* izolatlarının büyük çoğunluğu kapsülsüz tiplerdir. Çocuk KF olgularında sıklıkla izole edilen bu bakterinin KF akciğerlerinde gelişen patolojideki rolleri henüz açıklığa kavuşmamıştır. KF'te *H. influenzae* izolasyonu ile ilgili olarak karşılaşılan en büyük problem balgam örneğinde sıklıkla bulunan mukoid *P. aeruginosa* suşlarının kullanılan besiyerlerinde *H. influenzae* kolonilerini kaplaması ve izolasyonu hemen hemen olanaksız hale getirmesidir [2,11].

### ***Burkholderia cepacia* Kompleks ve Diğer İlişkili Bakteriler**

KF solunum yolu hastalığının daha geç dönemlerinde izole edilen bakteriler *B. cepacia* kompleks, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Achromobacter xylosoxidans* olarak sıralanabilir. Bunlar arasında en ciddi patolojiye yol açan *B. cepacia* kompleks grubunda bulunan patojenlerdir. *B. cepacia* kompleks içinde yaklaşık 10 farklı genomovar bulunmakta olup, bunlar içinde *B. multivorans* (genomovar II) ve *B. cenocepacia* (genomovar III) en sık hastalığa yol açan türlerdir (Tablo 1). *B. cenocepacia* hızla ilerleyen nek-

rotizan pnömoni ve ölümle karakterize "cepacia sendromu" olarak tanımlanan bir kliniğe neden olmaktadır [24,25]. *B. cepacia* öncelikle bir bitki patojeni olarak bilinmektedir. Aynı zamanda *B. cepacia* kompleks türleri sıklıkla tarım alanında biyopestisid ve ürün geliştirme ajanı olarak kullanılmaktadır [26].

Bu komplekste yer alan türler sıklıkla çoklu antibiyotik direnci taşımakta ve hastadan hastaya kolaylıkla geçebilmektedir. Çapraz bulaşın yanı sıra yeni olguların daha çok çevreden sporadik kazanıma bağlı olduğu düşünülmektedir. *B. cepacia* kompleks prevalansı merkezler arasında büyük değişkenlik göstermekle birlikte herhangi bir epideminin söz konusu olmadığı bölgelerde genellikle %10'un altındadır. Tür dağılımı coğrafi bölge ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasına göre değişmektedir. Medikal cihazların, dezenfektanların ve fizyoterapi için kullanılan bazı aletlerin *B. cepacia* kompleks tarafından kontaminasyonunun salgınlara yol açtığı bilinmektedir [26].

KF'te *B. cepacia* kompleks'e ait olarak en sık saptanan patojen *B. cenocepacia*'dir. *B. cenocepacia* Kuzey Amerika ve İtalya'da daha yaygınken, *B. multivorans* Avrupa'nın diğer bölgelerinde daha yaygındır [26,27]. Ancak İngiltere ve ABD'de bu bakterinin yayılımını engellemek amacıyla uygulanan sıkı enfeksiyon kontrol önlemleri sonucunda KF popülasyonunda *B. cenocepacia* prevalansı giderek azalırken *B. multivorans* sıklığının arttığı izlenmektedir [26].

Avrupa, Amerika ve İngiltere'deki KF Enfeksiyon Kontrol gruplarının oluşturduğu görüş birliği sonucu 2004 yılında yayınlanan dökümanlarda KF'li olguların *B. cepacia* kompleks varlığı ve çapraz bulaş açısından düzenli mikrobiyolojik sürveyansı önerilmektedir. Özellikle *B. cenocepacia* tanımlanan bir hastanın diğer KF hastalarına çapraz bulaşı önlemek için izole edilmesi gerektiği belirtilmektedir [5,25].

KF hastalarında *Burkholderia* türleri dışında diğer non-fermentatif gram negatif basillere de rastlanmaktadır. Bunlar arasında bulunan *Stenotrophomonas maltophilia* düşük virülansa sahip fırsatçı bir patojen olarak bilinmek-

**Tablo 1.** *Burkholderia cepacia* kompleks genomovarı (Gowan 2007, Mahentiringam 2008'den modifiye edilmiştir)

| Tür                               | Genomovar | Çapraz bulaş riski | KF akciğer hastalığında rolü |
|-----------------------------------|-----------|--------------------|------------------------------|
| <i>Burkholderia cepacia</i>       | I         | +                  | ±                            |
| <i>Burkholderia multivorans</i>   | II        | +                  | +                            |
| <i>Burkholderia cenocepacia</i>   | III       | +                  | +                            |
| <i>Burkholderia stabilis</i>      | IV        | ?                  | ±                            |
| <i>Burkholderia vietnamiensis</i> | V         | ?                  | ±                            |
| <i>Burkholderia dolosa</i>        | VI        | +                  | +                            |
| <i>Burkholderia ambifaria</i>     | VII       | ?                  | -                            |
| <i>Burkholderia anthina</i>       | VIII      | ?                  | ±                            |
| <i>Burkholderia pyrocinia</i>     | IX        | +                  | ?                            |
| <i>Burkholderia ubonensis</i>     | X         | ?                  | ?                            |

?: Yeterli klinik veri bulunmamaktadır, ±: çok zayıf olasılıklı

le birlikte immünkompromize olgularda ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara yol açabilmektedir. *S. maltophilia* gibi *Achromobacter xylosoxidans* da KF olgularında giderek artan oranlarda izole edilmektedir [2,3]. Bunun nedeni hem bu olguların yaşam sürelerinin uzamasına bağlı olarak solunum yollarını kolonize eden mikroorganizma çeşitliliğinin artması hem de gelişen mikrobiyolojik tanı tekniklerine bağlı olarak tanımlanabilen türlerin artmasıdır. *B. gladioli*, *B. cepacia* kompleks dışında bulunan bir tür olup akut solunum yolu enfeksiyonu, apse ve transplantasyon sonrası komplikasyonlarla ilişkilendirilmektedir. Son yıllarda KF örneklerinden tanımlanan türler arasında *Ralstonia* ve *Pandora* türleri de katılmıştır [3]. *Ralstonia* türlerinin KF'teki klinik önemi bilinmemekle birlikte, son yıllarda yayınlanan raporlar *Pandora* türlerinin ciddi solunum yolu hastalığı ve bakteriyemiden sorumlu olabileceğini belirtmektedirler [28]. Prevalansın artmasına rağmen tüm bu türlerin KF solunum yolu hastalığındaki patojenik rollerine dair kesin kanıt henüz bulunmamaktadır. Bu bakteri türleri ile ilgili en önemli problem yanlış olarak *B. cepacia* kompleks üyeleri olarak tanımlanmaları ve bu nedenle hastaya ciddi medikal, psikolojik ve sosyal yük getirmesidir.

#### Non-tüberküloz Mikobakteriler

KF'te non-tüberküloz mikobakterilere (NTM) bağlı hastalık tanımlanması, KF'in ciddi ilerleyişi yanında NTM'e bağlı hastalığın yavaş ilerlemesi, NTM ve KF'e bağlı klinik ve radyolojik bulguların çakışması gibi nedenler dolayısıyla güçlük göstermektedir. Bazı olgu raporları NTM enfeksiyonu ile KF'te klinik ve radyolojik bulguların kötüleşmesi arasında bir ilişki kurarken, diğer çalışmalar NTM izolasyonu ve buna bağlı ortaya çıkan etkiler arasında uzun bir zaman aralığı olduğunu vurgulamaktadırlar [28,29]. Bazı olgularda ise geçici bir NTM taşıyıcılığı olduğu saptanmıştır [29]. Olivier ve ark.nın ABD'de 21 KF merkezinden yaklaşık 1000 olgunun izlemi ile gerçekleştirdikleri çalışmanın sonuçlarına göre NTM prevalansı %13 olup, bunların %72'si *Mycobacterium avium* kompleks ve %16'sı *Mycobacterium abscessus*'dur. Bu çalışmada NTM pozitif bulunan olguların %40'ı 40 yaşın üstünde olup, akciğer patolojilerinin daha hafif düzeyde olduğu, daha fazla *S. aureus* ancak daha az *P. aeruginosa* kolonizasyonuna sahip oldukları belirlenmiştir [29].

NTM'nin KF kliniği üzerine olan etkileri konusunda farklı veriler bulunmaktadır. KF'te en belirgin kliniğe *M. abscessus*'un yol açtığı bildirilmektedir. NTM kültürü açısından bir kez pozitif olan bir KF olgusunda klinik gidişin bozulacağı veya mikobakteriyel enfeksiyona yönelik bir patoloji gelişeceği söylenemez. Öte yandan NTM açısından birkaç kez kültür pozitifliği olan ve balgam yaymasında aside dirençli basil saptanan olgularda klinik olarak anlamlı NTM enfeksiyonu gelişmesi daha olasıdır. NTM açısından pozitif kültürü olan bazı KF olgularının anti-tüberküloz tedaviye yanıt vermeleri, bu bakterilerin KF'teki klinik önemlerine dikkat çekmektedir [2,28,29].

#### Aspergillus ve Diğer Mantarlar

Mantarlar KF olgularının solunum örneklerinde sıklıkla saptanmaktadır. *Aspergillus fumigatus* olguların %40-60'ından, *Candida albicans* %75-90'ından izole edilmektedir. Mikrobiyolojik tanı tekniklerindeki ilerleme ile birlikte bu olgulardan sık izole edilen mantarlar arasında *Scedosporium* türleri de girmiştir. KF'te *Aspergillus* türleri astım, alerjik bronkopulmoner aspergillozis (ABPA), aspergilloma ve nadiren gerçek doku invazyonu ile karakterize enfeksiyona yol açarlar. KF'te aspergillozis tanısı klinik bulguların örtüşmesinden dolayı güçlük göstermektedir [30,31].

*Aspergillus*'a bağlı en sık görülen hastalık tablosu ABPA'dır. ABPA KF olgularının yaklaşık %10'unda görülmektedir. Akciğerlerde *A. fumigatus*'a bağlı gelişen bir aşırı duyarlılık tepkimesi olan ABPA sıklıkla yüksek IgE düzeyleri ve yüksek eozinofil sayısı (>1000/mm<sup>3</sup>) ile karakterizedir. KF'te sık antibiyotik kullanımı fungal kolonizasyonu kolaylaştırmaktadır. KF'te ABPA gelişimi için en önemli risk faktörlerinden biri de atopidir. Epizodik ve tekrarlayan bir hastalık olan ABPA, KF'te pulmoner hastalıklarının kötüleşmesine yol açmaktadır [2,31].

*A. fumigatus*'un dışında *Scedosporium apiospermum*, *Aspergillus terreus*, *Exophiala dermatitidis* ve *Scedosporium prolificans* da KF'te solunum yollarında kronik kolonizasyona neden olabilirler [30]. Fungal kolonizasyonun KF'te solunum yolu hastalığı üzerine etkisi tartışmalı olmakla birlikte filamentöz mantarlarla kolonizasyonun lokal inflamatuvar yanıtı arttırabileceği ve bunun da akciğer fonksiyonlarını kötüleştirebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Fungal kolonizasyonun saptanması özellikle akciğer transplantasyonu planlanan olgularda ciddi öneme sahiptir. KF olgularının balgam örneklerinde *Candida* türleri de sıklıkla izole edilmektedir. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin yoğun kullanımları sonucunda mukozaların *Candida* türleri ile kolonizasyonu beklenen bir sonuçtur. Ancak *Candida* türlerinin alt solunum yolu enfeksiyonu oluşumunda rolleri olduğuna dair bir bulgu henüz bulunmamaktadır [2].

#### KF'TE MİKROBİYOLOJİK ÖRNEKLERİN LABORATUVAR ANALİZİ

##### Etken Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanımlanması

KF mikrobiyolojisinde balgam ve bronkoalveolar lavaj (BAL) kültürünün kantitatif yapılması önerilmektedir. Kantitatif kültür ile elde edilen sonuçlar özellikle antipseudomonal antimikrobiyal tedavi sonuçlarının izlenmesinde yarar sağlamaktadır. Kantitatif kültür sonuçları değerlendirilirken geçerli olan kriter balgam veya BAL'da  $\geq 10^5$ cfu/ml bakteri bulunmasının alt solunum yolu enfeksiyonu lehine yorumlanmasıdır.

KF olgularının solunum yolu örneklerinin değerlendirilmesi mikrobiyoloji laboratuvarları için çeşitli yönlerden zorluk taşımaktadır. Balgamın yoğun vizkoz yapısı, polimikrobiyal üremeler ve bazı bakterilerin yavaş üreme hızı

**Tablo 2.** KF solunum yolu patojenlerinin kültürü için önerilen koşullar

| Organizma                               | Besiyeri  | İnkübasyon koşulları                     | Tanımlama metodu                        |
|---|---|--|---|
| <i>Haemophilus influenzae</i>           | 300 µg/ml basitrasin içeren at kanlı çikolata agar      | 35-37°C, %5-10 CO <sub>2</sub> , 72 saat | Konvansiyonel                           |
| <i>Staphylococcus aureus</i>            | Mannitol tuz agar<br>Columbia kanlı agar                | 35-37°C, normal atmosfer, 72 saat        | Konvansiyonel                           |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>           | MacConkey agar<br>EMB agar <sup>a</sup>                 | 35-37°C, normal atmosfer, 72 saat        | Konvansiyonel                           |
| <i>Burkholderia cepacia complex</i>     | BCSA <sup>b</sup> , OFBL <sup>c</sup><br>MacConkey agar | 35-37°C, normal atmosfer, 96 saat        | Moleküler                               |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>     | MacConkey agar<br>EMB agar                              | 35-37°C, normal atmosfer, 72 saat        | Konvansiyonel                           |
| <i>Achromobacter xylosoxidans</i>       | MacConkey agar<br>EMB agar                              | 35-37°C, normal atmosfer, 72 saat        | Konvansiyonel, moleküler                |
| <i>Ralstonia, Pandoraea, Inquilinus</i> | BCSA, OFBL<br>MacConkey agar<br>EMB agar                | 35-37°C, normal atmosfer, 96 saat        | Moleküler                               |
| <i>Nontüberküloz mikobakteriler</i>     | BACTEC<br>Löwenstein Jensen                             | 37°C, normal atmosfer, 6-8 hafta         | PCR RFLP <sup>d</sup><br>Sekans analizi |
| <i>Aspergillus spp.</i>                 | Sabouroud dekstroz agar                                 | 30°C, normal atmosfer, 3 hafta           | Konvansiyonel                           |

<sup>a</sup>: Eosin methylene blue agar, <sup>b</sup>: Burkholderia cepacia selective agar, <sup>c</sup>: Oxidative fermentative bacitracin lactose agar, <sup>d</sup>: Restriction fragment length polymorphism

göstermeleri nedeniyle kültürlerin değerlendirilmesi oldukça güçtür ve deneyim gerektirmektedir. Bunun yanı sıra kullanımda olan ticari otomatize sistemlerin çoğu KF patojenlerini doğru tanımlamada ve antibiyotik duyarlılık sonuçlarını saptamada yetersiz kalmaktadır. KF'te sekresyonlar sıklıkla vizköz olduğundan örneklerin uygun bir yöntemle çözünmesi gerekmektedir. Bu amaçla balgam dithiothreitol veya DNase gibi mukolitik ajanlar ile muamele edildikten sonra sulandırılmalı ve kantitatif kültür yapılmalıdır [32].

Polimikrobiyal kolonizasyon/enfeksiyon KF için karakteristik olduğundan örnekte bulunan her mikroorganizmanın ayrı ayrı izole edilmesi ve tanımlanması gerekmektedir. Mukoid *P. aeruginosa* kültür plaklarında sıklıkla diğer gram negatif ve pozitif bakterileri kapatarak izolasyonlarını zorlaştırmakta hatta önlemektedir. Bu nedenle KF solunum yolu örneklerinin mikrobiyolojik değerlendirmesi için seçici besiyerlerinin kullanılması gerekmektedir (Tablo 2). KF ortamında çoğu bakteri yavaş üreme fazına geçtiğinden, ekim yapılan besiyerlerinin 48-96 saat inkübasyonu bakteri izolasyon şansını arttırmaktadır.

KF örneklerinden *S. aureus* izolasyonu için önerilen besiyeri mannitol-tuz agar (MSA) dir. MSA aynı zamanda *S. aureus* küçük koloni varyantlarının izolasyonu için de önerilen besiyeridir. *S. aureus*'a özgü seçici bir besiyeri olan CHROMagar *Staph aureus* (CSA)ın duyarlılığı MSA'dan daha yüksektir, MSA'ya göre daha hızlı sonuç vermektedir ancak rutin uygulama için maliyeti yüksek bir besiyeridir. Örneklerde *S. aureus* KKV'nın yavaş ürettiği dikkate alınarak MSA'da inkübasyon süresi 72 saate kadar uzatılmalı, mannitol pozitif veya negatif, küçük

koloniler KKV açısından ileri incelemeye alınmalıdır [11,25].

*P. aeruginosa* pek çok besiyerinde kolaylıkla üremektedir. KF kültürlerinde üreyen *P. aeruginosa* suşları ile ilgili problem bir örnekte çok farklı morfolojilerde üreyebilmeleri ve bunların tek tek tanımlanma ve antibiyogram gerektirmesidir. Bir diğer sorun bu hastalarda karakteristik koloni morfolojisi, pigment göstermeyen, yavaş üreyen atipik özellikte *P. aeruginosa* izolatlarının varlığıdır. Standart mikrobiyolojik yöntemlerle zor tanımlanabilen bu izolatların ticari tanımlama sistemleri ile de doğru tanısında problemler yaşanmaktadır. Saiman ve ark. otomatize sistemlerle non-mukoid *P. aeruginosa* izolatlarının %57'sinin, mukoid izolatların ise %40'ının *P. aeruginosa* olarak doğru tanımlanabildiklerini saptamışlar ve sistemde inkübasyonun 48 saate uzatılması ile doğru tanımlama oranının arttığını belirtmişlerdir [33,34]. Wellinghausen ve ark. ise tipik *P. aeruginosa* morfolojisi göstermeyen izolatların %59'unun tanımlanamadığını veya yanlış tanımlandığını belirtmişler ve moleküler yöntemlerin KF izolatlarının doğru tanısı için gerekli olduğunu vurgulamışlardır [35].

İzole edilen bakterilerin doğru tanımlanması bu bakterilerin klinik önemlerini ve tedavi gereksinmesini de doğrudan etkilediğinden büyük önem taşımaktadır. KF'e özgü akciğer ortamında kronik kolonizasyon yapan bakteriler sıklıkla fenotipik değişikliklere uğramaktadırlar. Bu nedenle özellikle gram negatif non-fermentatif basillerin tür düzeyinde doğru tanısı için otomatize ticari tanı sistemlerine değil, standart metotlara başvurulması önerilmektedir. *P. aeruginosa* izolatları için belirtildiği gibi tüm

diğer gram negatif non-fermentatif bakteriler için de kesin tanıya yönelik moleküler yöntemlerin uygulanması gerektiği belirtilmektedir. Bu amaçla *B. cepacia* kompleks, *A. xylosoxidans*, *Ralstonia* ve *Pandora* başta olmak üzere gram negatif non-fermentatif bakterilerin moleküler tanıları için 16S ribozomal DNA sekanslarına yönelik PCR yöntemleri geliştirilmiştir ve referans merkezler başta olmak üzere bazı laboratuvarlarda uygulanmaktadır [35-37].

### **Mycobacterium Türleri**

*M. tuberculosis* KF'te nadir olarak izole edilmektedir. Ancak 1990'lerden itibaren non-tüberküloz mikobakterilerin (NTM) bu olgulardaki izolasyon sıklığının arttığına dair raporlar bildirilmektedir. KF örneklerinden NTM izolasyonu için dikkat edilmesi gereken nokta örneğin uygun şekilde dekontaminasyonunun yapılmasıdır. Bu amaçla N-asetil sistein NaOH uygulamasını takiben oksalik asit uygulaması *P. aeruginosa*'ya bağlı kontaminasyonu azaltarak NTM izolasyonunu arttırmaktadır [38]. NTM izolasyonu amacıyla BACTEC gibi otomatize sistemlerin kullanımı ve izolatların tür düzeyinde tanımlanması için PCR-RFLP analizi tercih edilen yöntemlerdir. NTM izolasyonu bu hastalarda genellikle geçici olmakla birlikte alınan balgam yaymalarının aside dirençli basil yönünden sürekli pozitif olması enfeksiyon olasılığını güçlendirmektedir ve tedaviyi gerektirmektedir.

### **Antibiyotik Duyarlılık Testleri**

KF hastalarının yaşam sürelerinin artışıyla antimikrobiyal tedaviler en önemli rollerden birini oynamaktadır. Hastalığın erken dönemlerinde izole edilen patojenler genellikle antibiyotiklere duyarlı iken yaş ilerledikçe giderek artan antibiyotik baskısı altında *P. aeruginosa* başta olmak üzere pek çok bakteride artan bir antibiyotik direnç problemi ile karşılaşmaktadır. Çoklu dirençli veya tüm antibiyotiklere dirençli ("panrezistan") izolatların oranı çeşitli merkezlerde giderek artmaktadır. Enfeksiyon hastalıklarının doğru tedavisinde temel ilke etken olan patojenin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre en uygun tedavinin başlanmasıdır. Günümüzde geçerli olan konvansiyonel antibiyotik duyarlılık testleri daha çok parenteral yolla uygulanan antibiyotiklere, ilaç dağılımı için bilinen farmakolojik modellere ve in-vitro koşullarda üretilen logaritmik üreme dönemindeki homojen planktonik bakteri popülasyonlarına göre standardize edilmiştir. KF örneklerinde konvansiyonel yöntemlerle yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinin klinik yanıtı belirleyici değeri tartışmalı bir konu olup, in-vitro in-vivo sonuçların uyumsuzluğu yönünde pek çok rapor bulunmaktadır [39,40]. KF'te gelişen kronik solunum yolu enfeksiyonlarında bilinen kriterlere göre elde edilen duyarlılık sonuçlarının her zaman geçerli olamayacağı açıktır. Çeşitli çalışmalarda *P. aeruginosa* ile kronik olarak enfekte olan hastalarda antibiyotiklerin in-vitro duyarlılığı ile tedaviye karşı klinik yanıt arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır [39]. Duyarlılık test sonucunda direnç

saptansa dahi klinik yanıt alınan durumlarda test sonucu dikkate alınmaksızın tedaviye devam edilmesi tercih edilmektedir.

KF'te antibiyotik direnci sadece bilinen direnç mekanizmalarına bağlı olmayıp, bu hastalığın solunum yollarında neden olduğu patolojiye bağlı olarak farklı direnç mekanizmaları da söz konusudur. Bu mekanizmaların başında "biyofilm direnci" ve "hipermutasyon" gelmektedir [40]. KF olgularından izole edilen çoklu dirençli izolatlarda kazanılmış direnç genlerinin saptanması bu suşlarda çoklu direncin nedenini daha çok hipermutasyon ile ilişkilendirmektedir. Oliver ve ark.nın 2000 yılında yayınladıkları araştırma KF *P. aeruginosa* izolatlarında antibiyotik direnci konusunda bir çığır açmıştır. Çalışılan KF olgularının %37'sinin hipermutabl *P. aeruginosa* izolatları ile kolonize olduğu bildirilen bu çalışmada hipermutabl suşlarda en sık etkilenen genin *mutS* olduğu saptanmıştır [41]. Hipermutabl suşların antibiyotiklere hipermutabl olmayan suşlardan daha dirençli oldukları in-vitro olarak hem kesitsel hem de longitudinal çalışmalarda gösterilmiştir [41,42]. Takiben yine KF olgularından izole edilen *S. aureus* izolatlarında da yüksek oranda hipermutabl suşlar saptanmış ve bu durum bu izolatlarda görülen makrolid direnci ile ilişkilendirilmiştir [43]. Hastanemizde izlenen KF olgularından izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının hipermutasyon açısından değerlendirildiği çalışmada 80 izolattan 26'sının hipermutant özelliğe sahip olduğu ve bu izolatlarda ortalama mutasyon frekansının  $2 \times 10^{-5}$  olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada hipermutant suşlarda aztreonam, seftazidim ve tobramislin direncinin hipermutant olmayan suşlara göre daha yüksek olduğu da saptanmıştır [44]. Bu veriler KF izolatlarında saptanan yüksek antibiyotik direnç oranlarını açıklayabilir. Bu suşlarda çoklu direnç sık karşılaşılan bir durumdur. *P. aeruginosa*'da nokta mutasyonlar  $\beta$ -laktamlara, aminoglikozidlere ve kinolonlara direnç gelişmesine yol açabilirler. Bu nedenle KF olgularına ait izolatların antibiyogramları değerlendirilirken üç veya daha fazla antibiyotik zonu içinde dirençli mutantlar saptandığında bu suşun hipermutant olabileceği rapor edilmeli ve klinisyen kombine antibiyotik tedavisinin gerekliliği konusunda bilgilendirilmelidir. Dirençli mutantların kolonizasyon veya enfeksiyonun erken dönemlerinde fazla olmadığı kabul edildiğinde agresif tekli antibiyotik tedavisi ile bu suşların üstesinden gelinebileceği, ancak enfeksiyonun ileri dönemlerinde özellikle hipermutant suşların artışına bağlı olarak mutlaka kombine antibiyotik tedavisi gerektiği çeşitli çalışmalarda vurgulanmaktadır.

KF patojenlerinin antibiyotik duyarlılık testleri için önerilen yöntemler agar bazlı yöntemlerdir. Disk difüzyon, E-test veya agar dilüsyon yöntemlerinin sıvı dilüsyon esaslı yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar verdiği ileri sürülmekteyse de bu yöntemlerin performansının non-mukoid izolatlarda mukoidlere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır [45]. Otomatize ticari sistemlerde KF izolatlarının tanımlanmasında karşılaşılan sorunlar antibiyotik duyarlılık sonuçları için geçerlidir. KF izolatlarının

duyarlılık değerlendirmesinde ticari sistemlerin referans metoda göre uyumu bazı sistemlerde kabul edilemez sınırlarda saptanmaktadır [33]. Son yıllarda geliştirilen sistemlerde uyum daha yüksek olarak saptansa da özellikle yavaş üreyen izolatlar söz konusu olduğunda “yanlış duyarlı” bildirimler olabileceği dikkate alınmalıdır.

KF duyarlılık testlerinde dikkat edilmesi gereken bir diğer konu farklı koloni morfolojilerinin duyarlılıklarının ayrı ayrı belirlenmesidir. Bir örnekte farklı morfolojide *P. aeruginosa* izolatları ile sık karşılaşılabilirdiğinden “karışık morfolojik” duyarlılık yöntemi önerilmiştir. Bu yöntemde farklı morfolojideki kolonilerden birer koloni süspansiyon edilerek ve antibiyotik duyarlılık testi gerçekleştirilmektedir. Böylelikle tüm morfolojilerin temsil edilmesi sağlanmaktadır [46]. Ancak “karışık morfolojik” duyarlılık testinde “direnc” daha çok gözden kaçmaktadır. Foweraker ve ark. aynı morfolojide sahip farklı kolonileri değerlendirdikleri çalışmaları sonucunda aynı morfolojinin farklı kolonilerinin antibiyotik direnci yönünden farklılık gösterebildiğini saptamışlar ve rutin duyarlılık testlerinin tekrarlanabilirliğinin düşük olduğunu ve direnci gözden kaçırabilme oranının yüksek olduğunu vurgulamışlardır [12].

KF ortamında *P. aeruginosa*’nın mukoid suşları dikkate alındığında planktonik hücrelerle yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinin gerçeği yansıtamayacağı ileri sürülmektedir. Bu nedenle duyarlılık testlerinin biyofilm ortamında gerçekleştirilmesi önerilmektedir [47,48]. Planktonik formda duyarlı olarak belirlenen bir izolat biyofilm ortamında dirençli olarak kendini gösterebilir. Biyofilmlerin antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlerinde bilinen direnç mekanizmaları, örneğin enzimatik inaktivasyon, eflüks pompaları, ilaç hedefinde mutasyon gibi mekanizmalar primer sorumlu faktörler olarak gözükmemektedir [8]. Herhangi bir şekilde antimikrobiyal ajanlara dirençli olmayan bir mikroorganizma biyofilm oluşturunca dirençli hale, biyofilmden ayrıldığında ise tekrar duyarlı hale dönüşebilmektedir. KF’te biyofilm ortamında antibiyotik direnci başlıca şu mekanizmalara bağlanmaktadır: i) Antimikrobiyal ajanın biyofilm içine düşük penetrasyonu, ii) Düşük büyüme hızı, iii) Genel stres yanıtı ve biyofilm direnç genlerinin ekspresyonu, iv) “Persister” fenotipi [8].

KF’te çoklu dirençli ve izolatların var olduğu kronik enfeksiyonların görülmesi, tekli antibiyotik duyarlılığını belirleyen konvansiyonel yöntemler ile yapılan testlerin yararını kısıtlayabilir. Kombine antibiyotik kullanımının gündemde olduğu KF enfeksiyonlarında kullanılacak kombinasyonu belirlemeye yönelik farklı duyarlılık yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında sinerji testleri ve çoklu kombinasyonlu bakterisidal test (MCBT) sayılabilir.

Antibiyotik sinerji testi ABD, Avustralya, Kanada ve Avrupa’da bulunan referans merkezlerinde KF hastalarından izole edilen suşlara uygulanmaktadır. Bu testte farklı antibiyotik kombinasyonlarının aktivitesi “checkerboard mikrodilüsyon” veya E-test yöntemi ile test edilir ve fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FIC) hesaplanır [48,49]. FIC indeksi  $\leq 0.5$  ise “sinerji”,  $\geq 4$  ise “antagonizma” etkisinden söz edilir. Sinerji testlerinin klinik validasyonu

henüz belli olmamakla birlikte yapılan bir çalışmada klinisyenlerin %96’sı bu testin yararlı olduğunu, %89’u bu testi tedavi kombinasyonlarını belirlemede kullandıklarını ve %84’ü hastaların bu test sonuçlarından fayda gördüklerini belirtmişlerdir [50].

MCBT on iki farklı antibiyotik kombinasyonlarında 298 ayrı kombinasyonda, ikili, üçlü veya dördü olarak test edilmesini sağlayan bir yöntemdir [51]. Maliyeti yüksek ve uygulaması zahmetli olan bu yöntem büyük ümitlerle uygulanmış ancak klinik yararlılığına ilişkin yapılan bir çalışma sonucunda MCBT’nin konvansiyonel duyarlılık testlerine bir üstünlüğü olmadığı sonucuna varılmıştır [52].

Sinerji testleri özellikle bakterinin panrezistan olması veya farklı gruptan iki antibiyotik seçimine olanak veremeyen çoklu direnç profiline sahip olması durumunda yarar sağlayabilir. Hastaya uygulanan tedaviye yanıt alınmaması veya ilaç alerjileri durumu da bu testlerin kullanımını gündeme getirebilir. Sinerji testlerinin veya konvansiyonel duyarlılık testlerinin klinik ile uyumsuzluğunun başında KF’e özel akciğer ortamı ve biyofilm varlığı gelmektedir. *In-vitro* çalışmalar KF hastalarında tedavi protokollerinin belirlenmesinde testlerin biyofilm ortamında yapılmasının yararını desteklese de bu sonuçların klinik yanıt etkileri henüz net değildir ve ileri, uzun süreli klinik çalışmalara gereksinim vardır.

#### KAYNAKLAR

1. Rajan S, Saiman L. Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Infect* 2002; 17: 47-56.
2. Foweraker J. Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull* 2009; 889: 93-110.
3. Goss CH, Burns JL. Exacerbations in cystic fibrosis - 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax* 2007; 62: 360-7.
4. Saiman L. Microbiology of early CF lung disease. *Paediatr Respir Rev* 2004; S367-9.
5. Döring G, Hoiby N, Consensus Study Group. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: A European Consensus. *J Cyst Fibros* 2004; 3: 67-91.
6. Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiol* 2007; 153: 917-23.
7. Govan JRW, Brown AR, Jones AM. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol* 2007; 2: 153-64.
8. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb Infect* 2003; 5: 1213-9.
9. Aaron SD, Ramotar K, Ferris W, et al. Adult cystic fibrosis exacerbations and new strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 811-5.
10. Ratjen F. Diagnosing and managing infection in CF. *Paediatr Respir Rev* 2006; 7S: S151-3.
11. Miller MB, Gilligan PH. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4009-15.
12. Foweraker JF, Laughton CR, Brown DJF, Bilton D. Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 921-7.

13. West SEH, Zeng L, Lee BL, et al. Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection with serology and assessment of risk factors. *JAMA* 2002; 287: 2958-67.
14. Pressler T, Frederiksen B, Skov M, Garred P, Koch C, Høiby N. Early rise of anti-*Pseudomonas* antibodies and a mucoid phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* are risk factors for development of chronic lung infection-A case control study. *J Cyst Fibros* 2006; 5: 9-15.
15. Ratjen F, Walter H, Haug M, et al. Diagnostic value of serum antibodies in early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42: 249-55.
16. Stone A, Saiman L. Update on the epidemiology and management of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2007; 13: 515-21.
17. Goerke C, Kraning K, Stern M, et al. Molecular epidemiology of community-acquired *Staphylococcus aureus* in families with and without cystic fibrosis patients. *J Infect Dis* 2000; 181: 984-9.
18. Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, et al. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 168-72.
19. Conway S, Denton M. *Staphylococcus aureus* and MRSA. In: Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A; eds. *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. Switzerland: Karger AG, 2006; 153-9.
20. Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, et al. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4424-7.
21. Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, et al. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 19890-5.
22. Sawicki GS, Rasouliyan L, Pasta DJ, et al. The impact of incident methicillin resistant *Staphylococcus aureus* detection on pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2008; 43: 1117-23.
23. Miall L, McGinley N, Brownlee K, Conway S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2001; 84: 160-2.
24. LiPuma JJ, Spilker T, Gill LH, Campbell PW 3rd, Liu L, Mahenthalingam E. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 92-6.
25. Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 57-71.
26. Mahenthalingam E, Baldwin A, Dowson CD. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol* 2008; 104: 1539-51.
27. Mahenthalingam E, Baldwin A, Vandamme P. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 2002; 51: 533-8.
28. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ Jr, et al. Nontuberculous mycobacteria. I: Multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 828-34.
29. Olivier KN, Weber DJ, Lee JH, et al. Nontuberculous mycobacteria. II: Nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 835-40.
30. Pihet M, Carrere J, Cimon B, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis - a review. *Med Mycol* 2009; 47: 387-97.
31. Que C, Geddes D. Respiratory fungal infections and allergic bronchopulmonary aspergillosis. In: Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A; eds. *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. Switzerland: Karger AG, 2006; 166-72.
32. May ML, Robson J. Microbiological diagnostic procedures in respiratory infections: suppurative lung disease. *Paediatr Respir Rev* 2007; 8: 185-94.
33. Saiman L, Burns JL, Larone D, et al. Evaluation of MicroScan Autoscan for identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 492-4.
34. Burns JL, Saiman L, Whittier S, et al. Comparison of two commercial systems (Vitek and MicroScan WalkAway) for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 39: 257-60.
35. Wellinghausen N, Köthe J, Wirths B, et al. Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4070-5.
36. McDowell A, Mahenthalingam E, Moore JE, et al. PCR-based detection and identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4247-55.
37. Liu L, Coenye T, Burns JL, et al. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylooxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1210-3.
38. Whittier S, Hopfer RL, Knowles MR, Gilligan PH. Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 861-4.
39. Smith AL, Fiel SB, Mayer-Hamblett N, et al. Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration: lack of association in cystic fibrosis. *Chest* 2003; 123: 1495-502.
40. Govan JRW. Multidrug -resistant pulmonary infection in cystic fibrosis - what does "resistant" mean? *J Med Microbiol* 2006; 55: 1615-7.
41. Oliver A, Canton R, Campo P, et al. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000; 288: 1251-3.
42. Macia MD, Blanquer D, Togores B, et al. Hypermutation is a key factor in development of multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3382-6.
43. Prunier AL, Malbruny B, Laurans M, et al. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis* 2003; 187: 1709-16.
44. Şener B, Çakar A, Özçelik U, et al. Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients: A link with antibiotic resistance. *J Cystic Fibrosis* 2005; 4: S56.
45. Burns JL, Saiman L, Whittier S, et al. Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1818-22.
46. Wolter JM, Kotsiu G, McCormack JG. Mixed morphotype testing of *Pseudomonas aeruginosa* cultures from cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 1995; 42: 220-4.

47. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1915-22.
48. Aaron SD, Ferris W, Ramotar K, et al. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4172-9.
49. Balke B, Hogardt M, Schmoldt S, et al. Evaluation of the E test for the assessment of synergy of antibiotic combinations against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25: 25-30.
50. Saiman L. Clinical utility of synergy testing for multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: "the motion for". *Paediatr Respir Rev* 2007; 8: 249-55.
51. Aaron SD, Vandemheen KL, Ferris W, et al. Combination antibiotic susceptibility testing to treat exacerbations of cystic fibrosis associated with multiresistant bacteria: a randomised double-blind, controlled clinical trial. *Lancet* 2005; 366: 463-71.
52. Aaron SD. Antibiotic synergy testing should not be routine for patients with cystic fibrosis who are infected with multi-resistant bacterial organisms. *Paediatr Respir Rev* 2007; 8: 256-61.