



doi • 10.5578/tt.68358
Tuberk Toraks 2019;67(3):151-161
Geliş Tarihi/Received: 21.05.2019 • Kabul Ediliş Tarihi/Accepted: 08.07.2019

KLİNİK ÇALIŞMA
RESEARCH ARTICLE

Kistik fibrozisli hastalarda anaerob bakterilerin rolünün araştırılması

Özlem DOĞAN¹
Ferda TUNÇKANAT¹
Güzin CİNEL²
Burçin ŞENER¹
H. Uğur ÖZÇELİK²
Elmas Ebru YALÇIN²
Deniz DOĞRU ERSÖZ²
E. Nural KİPER²

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

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

² Division of Pediatric Chest Diseases, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Ankara, Turkey

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Göğüs Hastalıkları Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZ

Kistik fibrozisli hastalarda anaerob bakterilerin rolünün araştırılması

Giriş: Kistik fibrozis (KF) hastalarının en önemli mortalite nedeni akut alevlenme ve iyileşme dönemlerinin birbirini izlediği tekrarlayan akciğer hastalığıdır. Son yıllarda ileri teknoloji ile gerçekleştirilen kültür dışı yöntemlere dayanan metagenomik çalışmalar, KF hastalarının akciğer ortamının mikrobiyolojik açıdan karmaşık dinamiğini göstermiş, anaerob bakterilerin artan önemine dikkat çekmiştir. Gerek moleküler temelli gerekse anaerob kültür yöntemleri ile yapılan çalışmalar, KF hastalarının akciğer ortamında aerob ve fakültatif anaerob bakteriler kadar ya da daha fazla olmak üzere anaerob bakterilerin de bulunduğunu göstermiştir. Ancak literatürde bu konuda yapılmış çalışmalar sınırlıdır.

Materyal ve Metod: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran ve izlemde olan KF'li hastaların balgam örneklerinden kantitatif kültür yöntemi ile anaerob bakteri varlığının önemini irdelemek ve üreyen anaerob bakterilerin antibiyotik duyarlılık durumlarını araştırarak tedaviye katkı sağlamak amacıyla izole edilen bakteriler klasik ve yarı otomatize yöntemlerle tanımlanmıştır. Anaerob bakterilerin duyarlılık testleri için referans yöntem olan agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya alınan 43 hastanın 35 (%81.4)'ünde, toplam 77 zorunlu anaerob bakteri izole edilmiştir. Toplanan balgam örneklerinde zorunlu anaerob/fakültatif bakterilerin toplam sayısı (ortalama 16×10^6), yalnızca aerob/fakültatif bakterilerin toplam sayısından (ortalama 14.1×10^6) daha fazla bulunmuştur. Anaerob kültür yapılmadığı durumda izolatların sadece %63.5'i saptanabilmektedir. Polimorfonükleer lökosit orta ve bol olarak gözlenen örneklerden ise çok sayıda zorunlu anaerob bakteri izole edilmiştir ($p=$

Makale atfı: Doğan Ö, Tunçkanat F, Cinel G, Şener B, Özçelik HU, Yalçın EE, et al. Kistik fibrozisli hastalarda anaerob bakterilerin rolünün araştırılması. Tuberk Toraks 2019;67(3):151-61.

Yazışma Adresi (Address for Correspondence)

Dr. Özlem DOĞAN
Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi,
Davutpaşa Caddesi No: 4 34010,
Topkapı, İSTANBUL Caddesi - TÜRKİYE
e-mail: ozldogan@ku.edu.tr

0.046). Yaşın anaerop bakteri izolasyonuna etkisi irdelendiğinde, 18 yaşından büyük hastalarda, anaerop bakteri izolasyonunun belirgin olarak arttığı görülmüştür. İzole edilen 77 zorunlu anaerop bakteriden 72'sinin ampisilin, sulbaktam-ampisilin, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, moksifloksasin, metronidazol, imipenem ve klindamisine karşı duyarlılıkları test edildiğinde, en etkisiz antibiyotüğün klindamisin olduğu, izolatların hiçbirisinde imipenem direnci görülmediği saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışma ülkemizde KF hastalarında anaerop bakterilerin rolü ve önemini gösteren ilk çalışmadır. KF hastalarından izole edilen anaerop bakterilerde saptanan direnç oranlarının yüksekliği kaygı vericidir. Bu nedenle bu hastaların takibinde aralıklı olarak anaerop kültür yapılması ve direnç oranlarının takip edilmesi tedavide yol gösterici olacaktır.

Anahtar kelimeler: Kistik fibrozis; anaerop bakteri; anaerop duyarlılık testleri; anaerop direnç

ABSTRACT

Investigation of role of anaerobic bacteria in cystic fibrosis patients

Introduction: Repetitive pulmonary infections are the main cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) patients. In recent years, non-culture dependent metagenomic studies showed complex dynamics of the pulmonary environment of CF patients and pointed out the importance of anaerobic bacteria. Molecular-based studies indicate that anaerobic bacteria can be found more than aerobic or facultative anaerobic bacteria in CF lung environment. However, limited number of studies are far away to clarify the importance of anaerobic bacteria in CF pulmonary disease.

Materials and Methods: The aim of this study was to evaluate the role of anaerobic bacteria in CF patients admitted to Hacettepe University, Pediatric Respiratory Diseases Department, by using quantitative culture method for both aerobic and anaerobic bacteria. Anaerobic bacteria were identified by conventional and semi-automated methods. Antibiotic susceptibilities were performed by agar dilution method.

Results: Seventy-seven anaerobic bacteria were isolated from 35 (81.4%) of 43 patients. The total count of anaerobes and facultative bacteria (mean 16×10^6), was higher than aerobes and facultative bacteria (mean 14.1×10^6). If anaerobe culture were not performed merely 63.65% of all species could be obtained. In patients whose samples yielded intermediate or high numbers of PMNLs, significantly more obligate anaerobic bacteria were isolated ($p= 0.046$). Patients older than 18 years were colonized with higher number of anaerobic bacteria. Susceptibilities of 72 isolates out of 77, against ampicillin, sulbactam-ampicillin, piperacillin, piperacillin-tazobactam, moxifloxacin, metronidazole, imipenem, and clindamycin were also evaluated. Clindamycin was found to be the least effective antibiotic among all. None of the isolates was resistant to imipenem.

Conclusion: This is the first study to show the role and importance of anaerobic bacteria in CF patients in our country. The resistance rates in anaerobic bacteria isolated from CF patients is concerning. Therefore, intermittent anaerobic culture and follow-up of resistance rates will be helpful in the follow-up of these patients.

Key words: Cystic fibrosis; anaerobic bacteria; anaerobic susceptibility tests; anaerobic resistance

GİRİŞ

Kistik fibrozis (KF) beyaz ırkta en sık rastlanan otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalıktır. Bu hastalığa "Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör (KFTR)" proteinini kodlayan ve aynı isimle anılan gendeki çeşitli mutasyonlar neden olmaktadır. Bu hastalarda bu proteindeki bozukluk nedeniyle klor ve sodyum taşınmasında sorun vardır. Elektrolit dengesindeki bozukluk sonucunda ekzokrin salgılarda hiperviskozite meydana gelir. KF birçok organ ve sistemi aynı anda etkilemesine rağmen, hastaların en önemli mortalite ve morbidite nedeni progresif akciğer hastalığıdır (1).

KF hastalarında *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* kompleksin sıklıkla neden olduğu, akut alevlenme ve aralıklı iyileşme dönemlerinin birbirini izlediği, tekrarlayan ve kronik akciğer yetmezliği ile sonuçlanan akciğer infeksiyonları

görölmektedir (2,3). Buna ek olarak bu hastaların solunum yolu örneklerinden daha nadir olarak *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandorea* spp. ve *Ralstonia* spp. de izole edilmektedir (4).

Son yıllarda moleküler yöntemlerdeki gelişmeler ışığında yapılan geniş kapsamlı metagenomik çalışmalar, bu hastaların bilinenin aksine, anaerop bakteriler başta olmak üzere çok daha fazla çeşitte bakteri ile kolonize olduğunu göstermiştir (5). Moleküler yöntemlerle ve konvansiyonel kültür yöntemleri ile yapılan bazı çalışmalarda anaerop bakterilerin KF solunum yollarında gösterilmesi, bu bakterilerin infeksiyonun patogeneziinde önemli rol oynayabileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır (6). Anaerop bakterilerin KF'li hastaların solunum yollarında kolonize olarak hastalık patogeneziinde rol oynaması, akut alevlenme dönemlerinde seçilecek antibiyotik tedavisinin yönlendirilmesi açısından da önem taşımaktadır (7).

KF hava yollarında oluşan yoğun mukus, bakteri artıkları ve ölü bağışıklık sistemi hücreleri birleşerek hava yollarının distalinde tıkaçlar oluşturmaktadır (8). Parsiyel oksijen basıncındaki azalma, oral kaviteden bu bölgeye göç eden anaerob bakterilerin hava yollarına yerleşmesine neden olmaktadır. Eş zamanlı olarak *P. aeruginosa* gibi aerob bakterilerin ortamdaki oksijeni hızla kullanmasıyla, zorunlu anaerob bakterilerin hayatta kalma şansı artmaktadır. Ayrıca KF'li hastaların akut alevlenme dönemlerinde sıklıkla kullanılan ve anaerob bakterilere etkisiz olan aminoglikozidler gibi bazı antibiyotikler uzun dönem kullanımda anaerob bakteriler üzerinde seçici bir etki oluşturabilmektedir. Bunlara ek olarak anaerob bakterilerin çeşitli "quorum sensing" molekülleri salgılayarak türler arası iletişime katkıda bulunduğu ve metabolizmaları sonucu ortaya çıkan farklı kimyasal bileşiklerin, diğer bakterilerin virülansını ve enfeksiyonun şiddetini artırdığı ve bakterilerin sağkalım sürelerini uzattığı düşünülmektedir (9-12).

Bu çalışmanın amacı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran KF'li hastaların balgam örneklerinde anaerob bakterilerin varlığını araştırmak; kantitatif kültür yöntemi ile anaerob bakteri varlığının *S. aureus* ve *P. aeruginosa* gibi KF hastalarından sıklıkla izole edilen etkenlerle ilişkisini ortaya koymak ve anaerob izolatların çeşitli antibiyotiklere duyarlılık durumunu araştırarak klasik tedavi seçeneklerine bir katkı sağlayabilmektir.

MATERYAL ve METOD

Hasta Seçimi ve Örneklerin Toplanması

Ocak 2012-Temmuz 2012 tarihleri arasında gerçekleştirilen bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Göğüs Hastalıkları Bilim Dalı'nda izlenmekte olup ter testi, klinik ve fenotipik bulgular ve genetik analizlere dayanılarak KF tanısı almış hastalarda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya Çocuk Göğüs Hastalıkları Bilim Dalı'nda poliklinik değerlendirmesi yapılan ve akut atak geçirdiği saptanan hastaların yanı sıra, akut alevlenme döneminde olmayıp da rutin kontrole gelen ve balgam çıkarabilen 43 hastadan rutin mikrobiyolojik inceleme için alınan 50 balgam örneği dahil edilmiştir. Akut alevlenme döneminde genelde hastaların balgam kültüründe, bakteri yükünde de artış saptanmaktadır. Bu çalışmada sadece balgam örnekleri kabul edilmiş, Çocuk Göğüs Hastalıkları Ünitesi'nde rutin mikrobiyolojik inceleme amacıyla sıklıkla kullanılan sürüntü örnekleri çalışmaya alınmamıştır.

Tüm hastaların cinsiyet ve klinik bilgileri kaydedilmiştir. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen bu çalışma için (Proje no: 011.D07.101.011) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alınmıştır.

Örneklerin İşlenmesi ve Direkt Mikroskopik İnceleme

Hastalardan alınan balgam örnekleri ivedikle laboratuvara ulaştırılmış ve direkt inceleme, aerob ve anaerob kültürlerinin yapılması amacıyla bekletilmeden homojenizasyon işlemine alınmıştır. Bu amaçla örnekler beş dakika vortekslenildikten sonra, 1/1 (V/V) oranında, önceden hazırlanan %1'lik dithiothreitol (Sputolizin®) solüsyonu ile sulandırılmıştır. Bu işlem viskoz balgamın çözünmesini sağlayarak mukus içine gömülmüş bakterilerin açığa çıkmasını sağlamakta, böylece hem direkt mikroskopinin hem de kültürün duyarlılığını artırmaktadır. Dithiothreitol ile muamele edilen örnekler 15 dakika 37°C'de inkübe edildikten sonra balgam tamamen homojen hale gelene kadar tekrar vortekslenmiştir. Homojenize örneklerin direkt mikroskopik incelenmesi amacıyla Gram boyama yöntemi kullanılmıştır. Örnekler, polimorfonükleer lökosit (PMNL) varlığı ve/veya sayısı ile bakteri varlığı ve çeşitliliği açısından değerlendirilmiştir.

Kültür ve Bakteri Sayımı

Rutin bakteriyolojik kültür amacıyla %5 koyun kanlı agar, MacConkey besiyeri, mannitol tuz agar, *B. cepacia* selektif agar ve çikolata besiyerleri (Becton, Dickinson, ABD) kullanılmıştır. Bu çalışma için rutin kültürden bağımsız olarak KF'li hastalarda anaerob ve aerob bakteri yükünün tayini için kantitatif kültür yöntemi uygulanmıştır. Kantitatif kültür ile bakteri sayısının tespiti için örnekler %0.9'luk serum fizyolojik solüsyonu ile 1/100 (V/V) ve 1/1000 (V/V) oranlarında sulandırılmıştır. Seyreltilen örneklerden aerob ve anaerob ortamda inkübe edilmek üzere farklı plaklara 50'şer µL ekim yapılmıştır. Aynı örnek için fakültatif anaerob bakteriler hem aerob hem de anaerob koloni sayımında toplam koloni sayısının içine dahil edilmiştir.

Anaerob bakteri sayısının tespiti için yukarıda anlatılan biçimde yapılan dilüsyonlardan genel üretim besiyeri olarak %5 koyun kanı eklenmiş, hemin ve K vitamini ile zenginleştirilmiş Schaedler agara (Becton, Dickinson, ABD) ve fenil etil alkol besiyerlerine (Becton, Dickinson, ABD) ekimler gerçekleştirilmiştir.

Anaerop kültürler, yavaş üreyen türlerin de gözle görülür koloni oluşturmasını desteklemek için yedi gün süre ile anaerop kavanoz sisteminde inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda koloni sayımı yapılarak ortalama koloni sayısı tespit edilmiştir.

Aerop Bakterilerin Tanımlaması

KF örneklerinden sıklıkla izole edilen *P. aeruginosa* ve *S. aureus* türü bakteriler koloni rengi, kokusu, kanlı agarda hemoliz oluşturma gibi makroskobik özellikleriyle ve çeşitli biyokimyasal testler (oksidaz, katalaz, koagülaz, glukoz fermentasyonu) kullanılarak geleneksel yöntemlerle tanımlanmıştır. Bu testlerle nonfermenter olduğu saptanan ancak *P. aeruginosa* olarak tanımlanmayan izolatlar Phoenix otomatize tanımlama sistemi (Becton, Dickinson, ABD) ile tanımlanmıştır. *Streptococcus pneumoniae* tanımlaması için, katalaz negatif alfa hemolizli koloniler oluşturan ve mikroskopide tipik gram-pozitif diplokok olarak görülen bakterilere optokin testi uygulanmıştır. Ağız boşluğunun normal flora elemanlarından olan *Neisseria* türleri ve *Streptococcus* cinsi bakteriler tür düzeyinde tanımlanmamıştır. Gram-negatif enterik basiller ise KF hastalarında kolonizan olarak kabul edildikleri için ileri tanımlama yapılmamıştır.

Anaerop Bakterilerin Tanımlanması

Zorunlu anaerop bakterilerin tanımlanmasında anaerop kanlı agar ve gerektiğinde fenil etil alkol agardaki farklı görülen her koloniden aerotolerans testi yapılmıştır. Anaerop olduğu aerotolerans testi ile ortaya konan bakterilerin ön tanımlamaları koloni morfolojisi, pigment oluşturma özellikleri, Gram boyanma özellikleri, 366 nm dalga boyundaki ultraviyole ışığında floresans oluşturma, özel potensli antibiyotik tanımlama disklerine (kanamisin 1000 µg, vankomisin 5 µg, kolistin 10 µg) duyarlılık gibi özellikleri ile katalaz ve spot-indol test sonuçlarına göre yapılmıştır. Ön tanımlamaları yapılan anaerop izolatların kesin tanımlamaları için "BBL Crystal Identification System, ID kit (Becton, Dickinson, ABD)" anaerop tanımlama sistemi kullanılmıştır.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Bu çalışmada, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" tarafından anaerop bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri için referans yöntem olarak önerilen agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır (13). Antibiyotiklerin sonuç konsantrasyon aralığı, ampisilin için 64-0.25 µg/mL, sulbaktam-ampisilin için 256-1 µg/mL, piperasilin ve piperasilin-tazobaktam

için 512-2 µg/mL, imipenem için 64-0.25 µg/mL, klindamisin için 64-0.25 µg/mL, metronidazol için 128-0.5 µg/mL ve moksifloksasin için 32-0.12 µg/mL olacak şekilde antibiyotik seri sulandırılmaları yapıldıktan sonra, farklı antibiyotik konsantrasyonlarını içeren besiyeri plakları hazırlanmıştır. Besiyeri olarak CLSI önerileri doğrultusunda hemin ve K vitamini eklenmiş, %5 koyun kanı ile zenginleştirilmiş Brucella agar (Becton, Dickinson, ABD) kullanılmıştır. Her deneyde kontrol olarak *Bacteroides fragilis* ATCC 25282 suşu kullanılmıştır. Antibiyotikli besiyeri plaklarına "multi point inoculator" ile bakteri ekimleri yapıldıktan sonra, plaklar anaerop ortamda, 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Antibiyotiklerin her izolat için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri saptanmış, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmada beta-laktamaz enziminin varlığı CLSI önerileri doğrultusunda kromojenik sefalosporin yöntemi ile (sefinaz diski, BBL Dry Slide, Becton Dickinson, ABD) araştırılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistiklerden sayı ve yüzde ile ortalama ± standart sapma değerleri kullanılmıştır. Bakteriyel koloni sayımı karşılaştırmalarında Mann-Whitney U test, aynı grup içinde karşılaştırmalarda Wilcoxon testi kullanılmıştır. Tüm istatistiksel analizler için SPSS 15.0 paket programı kullanılmış ve p< 0.05 bulunması halinde fark anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Üremelerin Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen 50 balgam örneğinin tümünün aerop kültüründe üreme olmuştur. Bu örneklerden toplam 136 aerop/fakültatif anaerop bakteri izole edilmiştir. Aerop bakteriyolojik tanımlama sonuçlarına göre, örneklerin %60'undan *P. aeruginosa* ve %48'inden *S. aureus* izolasyonu sağlanmıştır. Bu örneklerin 11 (%22)'inde *P. aeruginosa* ve *S. aureus* birlikte üremiştir. Çalışmaya alınan örneklerde üreyen aerop/fakültatif anaerop bakterilerin tanımlama sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

Anaerop üreme sonuçlarına bakıldığında örneklerin alındığı hastaların 35 (%81.4)'ünde ve toplam 50 balgam örneğinin 39 (%78)'unda en az bir zorunlu anaerop bakteri izole edildiği görülmektedir. Tüm örneklerden toplam 77 anaerop bakteri izole edilmiştir. Anaerop izolatların cins ve tür düzeyinde tanımlama sonuçları Tablo 2'de belirtilmiştir.

Tablo 1. Kistik fibrozis hastalarından alınan balgam örneklerinden izole edilen zorunlu aerop ve fakültatif anaerop bakterilerin cins ve türlere göre dağılımı

Cins/tür	Sayı
<i>Pseudomonas</i> (n= 31)	
<i>P. aeruginosa</i>	30
<i>P. luteola</i>	1
<i>Staphylococcus</i> (n= 24)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	24
<i>Streptococcus</i> (n= 33)	
<i>Streptococcus</i> spp.	32
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
<i>Achromobacter</i> spp.	1
<i>Burkholderia cepacia</i> kompleks	1
<i>Neisseria</i> spp.	41
Gram-negatif enterik basiller	5
Toplam	136

Örneklerin yalnızca aerop kültürünün yapıldığı durumda 50 balgam örneğinden 136 suş izolat elde edilmiştir. Ancak bu kültür şartlarına anaerop kültür de eklendiğinde izole edilen bakteri sayısı 214'tür. Anaerop kültür yapılmadığı durumda izolatların sadece %63.5'i saptanabilmektedir.

Bakteri Sayımı Sonuçları

Çalışılan balgam örneklerinde zorunlu anaerop bakterilerle, fakültatif anaerop bakterilerin toplam sayısı (ortalama 16×10^6), aerop bakterilerle fakültatif anaerop bakterilerin toplam sayısından (ortalama 14.1×10^6) daha yüksek bulunmuştur.

P. aeruginosa ve *S. aureus* İzolasyonunun Anaerop ve Aerop Bakteri Sayılarına Etkisi

Bu çalışmada, yapılan önceki çalışmalarla sağlıklı karşılaştırma yapabilmek ve daha çok örnek sayısını analiz edebilmek için üreyen patojen bakterilerden yalnızca *P. aeruginosa* ve *S. aureus* üremesinin bakteri sayılarına etkileri değerlendirilmiştir. Etken olarak kabul edilen, ancak birer örnekte üreyen *P. luteola*, *Achromobacter* spp., *B. cepacia* kompleks ve *S. pneumoniae* sayı düşüklüğü nedeniyle toplu analize alınmamıştır.

P. aeruginosa üreyen 30 örneğin 23 (%76.7)'ünde ve balgam örneklerinde *S. aureus* üreyen 23 hastanın 19 (%82.6)'unda en az bir tür zorunlu anaerop bakteri izole edilmiştir.

Tablo 2. Kistik fibrozis hastalarından alınan balgam örneklerinden izole edilen zorunlu anaerop bakterilerin cins ve türlere göre dağılımı

Cins/tür	Sayı
<i>Prevotella</i> (n= 24)	
<i>P. bivia</i>	9
<i>P. corporis</i>	6
<i>P. buccalis</i>	3
<i>P. melaninogenica</i>	2
<i>P. buccae</i>	1
<i>P. disiens</i>	1
<i>P. oralis</i>	1
<i>P. veroralis</i>	1
<i>Veillonella</i> spp.*	23
<i>Propionobacterium acnes</i>	6
<i>Actinomyces</i> (n= 6)	
<i>A. odontolyticus</i>	2
<i>A. viscosus</i>	2
<i>A. meyeri</i>	1
<i>A. naeslundii</i>	1
<i>Fusobacterium</i> (n= 5)	
<i>F. nucleatum</i>	4
<i>F. russi</i>	1
<i>Porphyromonas</i> (n= 3)	
<i>P. endodontalis</i>	2
<i>Porphyromonas</i> spp. **	1
<i>Parvimonas micra</i>	3
<i>Campylobacter urealyticus</i>	2
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1
<i>Egghertella lenta</i>	1
<i>Gemella morbillorum</i>	1
<i>Clostridium clostridioforme</i>	1
<i>Finegoldia magna</i>	1
Toplam	77

* Bu çalışmada tür düzeyinde kesin tanımlama için "Crystal Anerop Tanımlama Sistemi" kullanılmıştır, bu sistem *Veillonella* cinsindeki bakterileri tür düzeyinde ayırmadığı için *Veillonella* cinsi (spp.) olarak tanımlanmıştır.

** *Porphyromonas* spp. olarak tanımlanan bir izolat ise tür düzeyinde yakın sonuçlar vermesi ve tekrarlayan deneylerde de kesin olarak tanımlanmaması nedeniyle *Porphyromonas* spp. olarak isimlendirilmiştir.

P. aeruginosa izole edilen örneklerin 20 (%66.7)'sinde anaerop bakterilerin toplam koloni sayısı, *P. aeruginosa* koloni sayısından daha fazla bulunmuştur ($p=0.052$). *P. aeruginosa* izole edilen örneklerle izole edilmeyenler karşılaştırıldığında, *P. aeruginosa* izolasyonunun, aerop veya anaerop koloni sayısını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde etkilemediği izlenmiştir ($p>0.05$). Diğer taraftan *S. aureus* izolasyonunun

Tablo 3. Kistik fibrozis hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* izolasyonunun anaerop, fakültatif anaerop ve aerop bakteri koloni sayılarına etkisi

Bakteri izolasyonu (n= örnek sayısı)	Anaerop ve fakültatif anaerop koloni sayısı (x10 ⁶)	Aerop ve fakültatif anaerop koloni sayısı (x10 ⁶)
<i>P. aeruginosa</i> üreyen (n= 30)	14.3	18.7
<i>P. aeruginosa</i> üremeyen (n= 20)	18.6	7.2
<i>S. aureus</i> üreyen (n= 24)	19.8	17
<i>S. aureus</i> üremeyen (n= 26)	12.5	11.4

* İstatistiksel olarak anlamlı (p< 0.05).

anaerop koloni sayısını anlamlı ölçüde artırırken (p= 0.008), aerop ve fakültatif anaerop bakteri sayısına önemli bir etki yapmadığı görülmüştür (p≥ 0.05). KF hastalarında etken kabul edilen bu bakterilerin total bakteri sayısına etkileri Tablo 3'te verilmiştir.

PMNL Miktarının Bakteri Sayılarına Etkisi

Çalışmaya alınan balgam örneklerinde PMNL varlığı ve sayısı ile ilgili bulgular, aerop ve anaerop üremelere etkisi açısından irdelenmiştir. PMNL varlığı nadir olarak izlenen hastaların hiçbirisinden anaerop bakteri izole edilemezken, PMNL miktarı orta ve bol olarak gözlenen örneklerde anaerop bakteri üremesi gözlenmiştir. Bu örneklerde anaerop izolasyon sıklığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p= 0.046). Öte yandan PMNL sayısının aerop koloni sayısına etkisi saptanmamıştır (p> 0.05).

Hastaların Yaş Dağılımının Bakteri Sayılarına Etkisi

Çalışmaya alınan hastaların (n= 43) ortalama yaşı 16.8 (± 6.4) olarak saptanmıştır. Yaşın kronik kolonizasyona etkisini gözlemek amacıyla 18 yaşından büyük hastaların (n= 20) ve daha küçük hastaların (n= 30) anaerop koloni miktarları karşılaştırılmıştır. Anaerop bakteri yükü 18 yaşından büyük hastalarda ortalama 27.3 x 10⁶, 18 yaşından küçük hastalarda ise 8.5 x 10⁶ olarak saptanmıştır (p> 0.05). Yaşı 18'den büyük olan 20 erişkin hastanın 17 (%85)'sinde *P. aeruginosa* izole edilmiştir. Yaşı 18'den küçük olan hastaların 13 (%43.3)'ünde *P. aeruginosa* izolasyonu saptanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı olarak saptanmasa da (p> 0.05) *P. aeruginosa* kolonizasyonu da anaerop koloni sayısı gibi yaşla birlikte artmaktadır.

Anaerop Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

İzole edilen 77 zorunlu anaerop bakteriden beşi kaybedildiği için 72 izolatin ampisilin, sulbaktam-ampisilin, piperasilin, piperasilin-tazobaktam, moksiflok-

sasin, metronidazol, imipenem ve klindamisine karşı duyarlılıkları test edilmiştir. Tüm izolatların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ile antibiyotik direnç oranları Tablo 4'te verilmiştir.

Bu çalışmada tüm izolatlarda ampisiline karşı yüksek oranda saptanan direnç dikkat çekmektedir. Ampisiline en yüksek direnç *Prevotella* cinsi bakterilerde gözlenirken, diğer bakterilerle karşılaştırıldığında *Veillonella* türlerinde imipenem hariç her antibiyotiğe karşı diğer bakterilere göre daha yüksek direnç oranları saptanmıştır.

Metronidazole karşı en yüksek direnç yüzdesi beklendiği gibi gram-pozitif basillerde gözlenmiştir (%46.2). İkinci sırada *Veillonella* türleri yer almaktadır (%21.7). *Prevotella* cinsinde metronidazol direnci görülmezken, tüm izolatlar birarada değerlendirildiğinde, çalışmaya alınan suşların metronidazol direnci ortalama %19.7 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada tüm izolatların ortalama moksifloksasin direnci %37.5 olarak bulunmuştur. Bu antibiyotiğe karşı en yüksek direnç yüzdesi %69.8 ile *Veillonella* cinsinde gözlenmiştir. Gruplar moksifloksasin direnç yüzdelere göre sıralandığında, *Veillonella* türlerini, %60 direnç oranıyla anaerop gram-pozitif koklar takip etmektedir.

Bu çalışmada tüm izolatların imipeneme duyarlı olduğu görülmüştür. En yüksek direnç ise tüm izolatlar için ortalama %70.8 direnç yüzdesi ile klindamisine karşı gözlenmiştir.

Beta-laktamaz varlığı nitrosefin yöntemi ile araştırıldığında antibiyotik duyarlılık testi uygulanan 72 izolatin 17 (%23.6)'sinin beta-laktamaz ürettiği saptanmıştır. Beta-laktamaz üreten toplam 17 izolattan 16'sı *Prevotella* türleri, biri ise *F. nucleatum*'dur. Antibiyotik duyarlılıkları çalışılan 21 *Prevotella* cinsi bakteriden %76.2'sinin beta-laktamaz ürettiği görülmüştür.

Tablo 4. İzole edilen bakterilerin çalışılan sekiz antibiyotik için MiK_{50} , MiK_{90} değerleri ve direnç oranları

Antibiyotik	MiK_{50} MiK_{90} ($\mu g/mL$) İzolot sayısı (%)	Bakteri				
		<i>Prevotella</i> (n= 21)	<i>Veillonella</i> (n= 23)	Gram-pozitif basil* (n= 13)	Gram-negatif basil** (n= 10)	Gram-pozitif kok# (n= 5)
AMP	MiK_{50}	8	1	0.5	1	0.5
	MiK_{90}	64	8	1	4	0.5
	Direnç	18 (%85.7)	16 (%69.8)	5 (%38.5)	6 (%60)	0
SAM	MiK_{50}	2	2	< 1	< 1	< 1
	MiK_{90}	8	16	8	4	< 1
	Direnç	0	4 (%17.4)	0	1 (%10)	0
PiP	MiK_{50}	8	64	< 2	2	< 2
	MiK_{90}	32	128	128	64	< 2
	Direnç	0	15 (%65.2)	2 (%15.4)	3 (%30)	0
PiP/TAZ	MiK_{50}	4	32	< 2	2	< 2
	MiK_{90}	8	128	64	32	< 2
	Direnç	0	11 (%47.8)	2 (%15.4)	0	0
MXF	MiK_{50}	1	4	0.5	0.5	4
	MiK_{90}	4	8	8	4	8
	Direnç	3 (%14.3)	16 (%69.8)	2 (%15.4)	3 (%30)	3 (%60)
MTZ	MiK_{50}	< 0.5	8	8	< 0.5	< 0.5
	MiK_{90}	2	64	128	16	32
	Direnç	0	5 (%21.7)	6 (%46.2)	2 (%20)	1 (%20)
İPM	MiK_{50}	< 0.25	1	< 0.25	< 0.25	< 0.25
	MiK_{90}	< 0.25	4	0.5	0.5	< 0.25
	Direnç	0	0	0	0	0
CC	MiK_{50}	16	4	8	2	32
	MiK_{90}	> 64	> 64	> 64	32	> 64
	Direnç	15 (%71.4)	15 (%65.2)	11 (%84.6)	5 (%50)	5 (%100)

AMP: Ampisilin, SAM: Sulbaktam-ampisilin, PiP: Piperasilin, PiP-TAZ: Piperasilin-tazobaktam, MXF: Moksifloksasin, MTZ: Metronidazol, İPM: İmipenem, CC: Klindamisin.
* Gram-pozitif basil: *Actinomyces* türleri (n= 6), *P. acnes* (n= 6) ve *L. acidophilus* (n= 1) birlikte değerlendirilmiştir.
** Gram-negatif basil: *Fusobacterium* türleri (n= 5), *Porphyromonas* türleri (n= 3) ve *C. urealyticus* (n= 2) birlikte değerlendirilmiştir.
Gram-pozitif kok: *Parvimonas micra* (n= 3), *Finexgoldia magna* (n= 1) ve *Gemella morbillorum* (n= 1) birlikte değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA

Son yıllarda metagenomik çalışmaların hız kazanmasıyla, bazı araştırmacılar dikkatlerini KF'li hastaların akciğer ortamına yoğunlaştırmıştır (14,15). Rogers ve arkadaşları KF hastalarının akciğerlerinde bulunan mikroorganizma çeşitliliğini "Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)" yöntemi ile inceleyerek bu hastaların akciğerlerindeki zorunlu anaerob bakterilerin varlığına dikkat çekmişlerdir (16). Sibley ve arkadaşları hem konvansiyonel kültür yöntemlerinin hem de metagenomik analiz yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalarında, rutin aerob kültür yöntemlerinin yetersizliğini göstermişlerdir (6).

Çalışmanın sonuçlarına göre, KF hastalarında rutin olarak uygulanan aerob kültüre ek olarak anaerob kültürün de yapılması sonucunda izolasyon oranı %65.1'den %84'e yükselmektedir. Benzer olarak bizim çalışmamızda da sadece aerob kültür ile, aerob ve anaerob kültürde üreyen toplam izolatların yalnızca %65.6'sının saptanabildiği gösterilmiştir. Çalışmamızda anaerob bakteriler arasında en sık *Veillonella* türleri izole edilirken, ardından sırasıyla *Prevotella*, *Actinomyces*, *Propionibacterium* türlerinin izole edildiği gözlenmektedir. Tunney ve arkadaşları konvansiyonel kültür yöntemleriyle KF'li hastalarda anaerob bakterilerin varlığının gösterilmesini

amaçladıkları çalışmalarında *Prevotella*, *Actinomyces*, *Propionibacterium* ve *Veillonella* türlerinin başı çektiği birçok farklı cins ve türde anaerop bakteri izole etmişlerdir (17).

İzole edilen bakterilerin türlerine bakıldığında oral mikrobiyotada sık bulunan türlerin izolasyonu dikkati çekmektedir. Bu durum balgamın ağız mikrobiyotası ile kontaminasyon ihtimalini akla getirmektedir. Rogers ve arkadaşları KF'li hastalardan hem balgam örneği hem de boğaz sürüntüsü olarak bakteriyel çeşitliliği irdelemişlerdir (18). Çalışmada balgam örnekleriyle boğaz sürüntüsü örneklerinden farklı bakterilerin bulunduğu gösterilmiştir. Anaeroplardan balgam örneklerinde yoğunluğunun sayıca fazla olması da oral kontaminasyondan çok bu bakterilerin alt solunum yolunda kolonize olduklarını düşündürmektedir. Oral mikrobiyotaya, anaerop bakteriler için bir kaynak oluşturmaktadır. Buradaki bakteriler ağızdan alt solunum yollarına inerek burada kolonizasyon ve/veya enfeksiyona neden olmaktadır. Ayrıca bu hastalardaki azalmış mukosilyer aktivite de mikroaspirasyonlara neden olarak bu sürece katkı sağlamaktadır.

Duan ve arkadaşları çalışmalarında mikrobiyotaya üyelerinin *P. aeruginosa*'nın virülans faktörlerini güçlendirdiğini göstermişlerdir (9). Bizim çalışmamızda, PMNL miktarının yüksek olduğu durumda, *P. aeruginosa* koloni sayısı değişmediği halde, anaerop koloni sayısının PMNL artışı ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. Bu bulgu, anaerop bakteri miktarındaki artışın *P. aeruginosa* enfeksiyonuna bağlı immün yanıtı ve akut alevlenmeyi şiddetlendirdiğini düşündürmektedir. Anaerop bakterilerin metabolik ürünü olan kısa zincirli yağ asitlerinin inflamasyonu tetikleyerek interlökin-8 miktarını artırdığı ve kemotaksisi hızlandırarak akut alevlenmeye katkı sağladığı gösterilmiştir (19). Yapılan bir başka çalışmada ise akut alevlenmede, anaerobik fermentasyon ürünlerinin arttığı gösterilmiştir (24). Ulrich ve arkadaşları anaerop bakterilerin *P. aeruginosa*'nın virülansına etkisini göstermek için, bir grup fareye *P. aeruginosa*'yı tek başına, diğer gruba ise *Prevotella intermedia* ile birlikte vermişlerdir (20). *Prevotella* ile birlikte *P. aeruginosa*'nın çok daha güçlü inflamatuvar yanıt oluşturduğunu ve hayvanlarda sağkalımın azaldığını gözlemlemişlerdir. Benzer bir çalışmada ise *V. parvula* ile *P. aeruginosa* arasındaki virülans ilişkisi hayvan modelinde incelenmiş ve *V. parvula*'nın eş zamanlı enfeksiyonlarda *P.*

aeruginosa'nın virülansını artırdığı tespit edilmiştir (12). Bunlara ek olarak anaerop bakterilerin oluşturduğu beta-laktamaz tipi enzimler de *P. aeruginosa*'yı beta-laktam antibiyotiklerin etkisinden koruyarak dolaylı yoldan direnç kazanmasını sağlamaktadır (11). Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre, *P. aeruginosa* izolasyonu anaerop bakteri izolasyonuna istatistiksel olarak etki etmemektedir. Öte yandan literatürde daha önce üzerinde durulmamış farklı bir bulgu olarak *S. aureus* izolasyonu ile anaerop bakteri izolasyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0.008$).

Yeni nesil sekanslama teknikleriyle yapılan bazı çalışmalarda yaşın ilerlemesiyle KF hastalarında bakteriyel çeşitliliğin azaldığı ve en sık *P. aeruginosa* olmak üzere tek tip bakterinin hakim hale geldiği, bu değişimin prognozu olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (21,22). Rutin mikrobiyolojik tekniklerle izole edilebilen sınırlı sayıda bakteri türüne yönelik agresif antimikrobiyal kullanımı, bu polimikrobiyal ortamda seçici bir baskı oluşturmaktadır (23). Bizim çalışmamızda da anaerop bakteri izolasyonunun yaşla birlikte istatistiksel olarak anlamlıya yakın derecede arttığı gözlenmiştir. Benzer olarak *P. aeruginosa* kolonizasyonu da yaşla artmaktadır. Bu nedenle sınırlı sayıda seçici besiyerinin kullanımıyla elde edilen aerop kültür sonuçları, ortamın gerçek mikrobiyolojik çeşitliliğini ortaya koymaktan uzaktır ve aynı zamanda tedaviye yön vermek ya da prognozu tahmin etmek için de yetersiz kalmaktadır. Zemanick ve arkadaşları yaptıkları çalışmada akut alevlenme bulguları olan hastaların %10'unun kültür sonuçlarının, rutin mikrobiyolojik kültür yöntemleriyle negatif olduğunu saptamışlardır (24). Bu hastaların %75'inde direkt incelemede PMNL bol miktarda saptanmıştır. Antibiyotik tedavisinin her iki grupta etkisinin olmaması, anaerop bakteriler gibi kullanılan antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların akut alevlenmeye neden olabileceğini akla getirmektedir.

Anaerop bakterilerde antibiyotik direnci başta *Bacteroides fragilis* ve diğer *Bacteroides* türleri olmak üzere son yıllarda giderek artmaktadır. Worlitzsch ve arkadaşları çalışmalarında izole ettikleri anaerop bakterilerin %58'inin KF hastalarında sık kullanılan antibiyotiklere dirençli olduğunu saptamışlardır (25). Bizim çalışmamızda da izole edilen anaerop bakterilerde antibiyotik direnci daha önce yapılan antimikrobiyal sürveyans çalışmalarına göre daha yüksek oranlarda saptanmıştır (26-30).

Bu çalışmada *Prevotella* türlerinde ampisilin direnci %85.7 olarak saptanmış, ancak piperasiline karşı direnç gözlenmemiştir. *Prevotella* türlerinin tümü beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına karşı duyarlı bulunmuştur. *Prevotella* izolatlarının %76.2'sinde beta-laktamaz ürettiğinin gösterilmesi bu türde ampisilin direncinin önemli ölçüde beta-laktamaz yapımı ile ilgili olduğunu, ancak başka mekanizmaların da etkili olabileceğini düşündürmüştür. Sherald ve arkadaşları KF hastalarından izole edilen *Prevotella* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarını, sağlıklı ve ciddi infeksiyonu olan kişilerden izole edilen *Prevotella* suşlarının duyarlılığı ile karşılaştırmışlar ve KF hasta izolatlarının diğer gruplara göre çok daha dirençli olduğunu saptamışlardır (31). Penisilin grubu antibiyotiklere yüksek direnç oranlarının saptandığı bir diğer grup ise *Veillonella* türleridir (ampisilin direnci %69.8; piperasilin direnci %65.2). Ancak bu bakterilerde beta-laktamaz inhibitörleriyle kombinasyonlara karşı da direnç bir hayli yüksek bulunmuştur (sulbaktam/ampisilin direnci %17.4, piperasilin/tazobaktam direnci %47.8). Bu çalışmada *Veillonella* türlerinde sadece penisilinlere değil imipenem hariç çalışılan her antibiyotiğe karşı yüksek direnç yüzdeleri saptanmıştır. Bu durum *Veillonella* türlerinin antibiyotik direncinde beta-laktamaz dışı diğer direnç mekanizmalarının öncelikli olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalarda anaerob bakterilerde giderek artan klindamisin direnci dikkati çekmektedir (28,29). Bu çalışmada tüm suşların ortalama klindamisin direnci %70.8 olarak saptanmıştır. Worlitzsch ve arkadaşları KF hastalarında anaerobların duyarlılıklarını araştırdıkları çalışmalarında, ortalama klindamisin direncini %23.2 olarak bildirmişlerdir (25). Klindamisin direncinin bizim çalışmamızda diğer çalışmalara oranla daha yüksek saptanmasını, anaerob bakterilerde özellikle klindamisin direncinin çalışılan coğrafi bölge ve merkezler arası önemli değişiklikler göstermesine bağlamak mümkündür (32,33).

Son yıllarda anaerob bakterilerde artan metronidazol direnci dikkat çekmektedir. KF hastalarında anaerob bakterilerin dirençlerinin gösterildiği iki çalışmada Tunney ve arkadaşları ortalama metronidazol direncini %47, Worlitzsch ve arkadaşları ise %48.6 olarak bildirmişlerdir (17,25). Bu çalışmada ise tüm suşlarda metronidazol direnci %19.7 olarak saptanmıştır. Literatürde *Prevotella* türlerinde metronidazol direnç oranları %0-3 arasında değişmektedir (32,34). Bu

çalışmada ise *Prevotella* suşlarında metronidazol direnci saptanmamıştır. Çalışmamızda, diğer gram-negatif basillerde metronidazol direnç oranı %20 olarak bulunmuştur.

Anaerob bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanımı önerilen bir diğer antibiyotik ise moksifloksasindir. Diğer antibiyotiklere göre daha yeni kullanıma girmiş olmasına rağmen, kliniklerde kullanımını takiben moksifloksasin dirençli anaerob izolatlar bildirilmeye başlamıştır (33). Bu çalışmada moksifloksasine karşı en yüksek direnç gram-pozitif anaerob koklarda ve *Veillonella* türlerinde saptanmıştır. Tüm izolatlar birlikte değerlendirildiğinde, bu çalışmada hemen tüm antibiyotiklere karşı saptanan direnç oranları literatürdeki oranlara göre daha yüksektir.

Bu çalışma ülkemizde KF hastalarında anaerob bakterilerin rolü ve önemini gösteren ilk çalışmadır. Gelişen dizileme yöntemleriyle yapılan metagenomik çalışmalar anaerob bakterilerin KF hastalarında varlığını ve yoğunluğunu göstermiştir (35). Bu çalışmalar ışığında bu konuda artan veriler, anaerob bakterilerin KF hastalarında klinik duruma ve prognoza etkisini aydınlatmaktan halen uzaktır (5,36). Bir diğer önemli nokta ise, moleküler yöntemlerle yapılan bu çalışmalarda ölü-canlı bakteri ayrımının ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılamıyor olmasıdır. Bu durum geleneksel yöntemlerle yapılan emek yoğun çalışmaların önemini vurgulamaktadır. Bu çalışmada KF hastalarından izole edilen anaerob bakterilerde saptanan yüksek direnç oranlarını, bu hastalarda tedavide sık ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ile açıklamak mümkünse de direnç oranlarının yüksekliği kaygı vericidir. Bu nedenle bu hastaların takibinde aralıklı olarak anaerob kültür yapılması ve direnç oranlarının takip edilmesi tedavide yol gösterici olacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

YAZAR KATKISI

Anafikir/Planlama: ÖD, FT, BS, HUÖ, EEY, DDE, NK

Analiz/Yorum: ÖD, FT, BS

Veri sağlama: Tüm yazarlar.

Yazım: ÖD, FT

Gözden Geçirme ve Düzeltme: Tüm yazarlar.

Onaylama: Tüm yazarlar.

KAYNAKLAR

1. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet* 2016;388(10059):2519-31.
2. Cox MJ, Allgaier M, Taylor B, Baek MS, Huang YJ, Daly RA, et al. Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS One* 2010;5(6):e11044.
3. Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:299-323.
4. Bittar F, Rolain JM. Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:809-20.
5. Sherrard LJ, Bell SC, Tunney MM. The role of anaerobic bacteria in the cystic fibrosis airway. *Curr Opin Pulm Med* 2016;22:637-43.
6. Sibley CD, Grinwis ME, Field TR, Eshaghurshan CS, Faria MM, Dowd SE, et al. Culture enriched molecular profiling of the cystic fibrosis airway microbiome. *PLoS One* 2011;6:e22702.
7. Rabin HR, Surette MG. The cystic fibrosis airway microbiome. *Curr Opin Pulm Med* 2012;18:622-7.
8. Kolpen M, Hansen CR, Bjarnsholt T, Moser C, Christensen LD, van Gennip M, et al. Polymorphonuclear leucocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax* 2010;65:57-62.
9. Duan K, Dammel C, Stein J, Rabin H, Surette MG. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol* 2003;50:1477-91.
10. Field TR, Sibley CD, Parkins MD, Rabin HR, Surette MG. The genus *Prevotella* in cystic fibrosis airways. *Anaerobe* 2010;16:337-44.
11. Sherrard LJ, McGrath SJ, McIlreavey L, Hatch J, Wolfgang MC, Muhlebach MS, et al. Production of extended-spectrum beta-lactamases and the potential indirect pathogenic role of *Prevotella* isolates from the cystic fibrosis respiratory microbiota. *Int J Antimicrob Agents* 2016;47:140-5.
12. Pustelny C, Komor U, Pawar V, Lorenz A, Bielecka A, Moter A, et al. Contribution of *Veillonella parvula* to *Pseudomonas aeruginosa*-mediated pathogenicity in a murine tumor model system. *Infect Immun* 2015;83:417-29.
13. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved standard M11-A7 [press release]. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2007.
14. Zemanick ET, Harris JK, Wagner BD, Robertson CE, Sagel SD, Stevens MJ, et al. Inflammation and airway microbiota during cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *PLoS One* 2013;8:e62917.
15. Boutin S, Dalpke AH. Acquisition and adaptation of the airway microbiota in the early life of cystic fibrosis patients. *Mol Cell Pediatr* 2017;4:1.
16. Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones C, Bruce KD. characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16s ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol* 2004;42:5176-83.
17. Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering C, Muhlebach MS, et al. Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:995-1001.
18. Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones C, Kehagia V, et al. Use of 16S rRNA gene profiling by terminal restriction fragment length polymorphism analysis to compare bacterial communities in sputum and mouth-wash samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2006;44:2601-4.
19. Mirkovic B, Murray MA, Lavelle GM, Molloy K, Azim AA, Gunaratnam C, et al. The role of short-chain fatty acids, produced by anaerobic bacteria, in the cystic fibrosis airway. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:1314-24.
20. Ulrich M, Beer I, Braitmaier P, Dierkes M, Kummer F, Krismer B, et al. Relative contribution of *Prevotella intermedia* and *Pseudomonas aeruginosa* to lung pathology in airways of patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2010;65:978-84.
21. Zhao J, Schloss PD, Kalikin LM, Carmody LA, Foster BK, Petrosino JF, et al. Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:5809-14.
22. Fodor AA, Klem ER, Gilpin DF, Elborn JS, Boucher RC, Tunney MM, et al. The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. *PLoS One* 2012;7:e45001.
23. Klepac-Ceraj V, Lemon KP, Martin TR, Allgaier M, Kembel SW, Knapp AA, et al. Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 2010;12:1293-303.
24. Zemanick ET, Wagner BD, Harris JK, Wagener JS, Accurso FJ, Sagel SD. Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis with negative bacterial cultures. *Pediatr Pulmonol* 2010;45:569-77.
25. Worlitzsch D, Rintelen C, Bohm K, Wollschlager B, Merkel N, Borneff-Lipp M, et al. Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:454-60.
26. Marchand-Austin A, Rawte P, Toye B, Jamieson FB, Farrell DJ, Patel SN. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of anaerobic bacteria in Ontario, 2010-2011. *Anaerobe* 2014;28:120-5.
27. Novak A, Rubic Z, Dogas V, Goic-Barisic I, Radic M, Tonkic M. Antimicrobial susceptibility of clinically isolated anaerobic bacteria in a University Hospital Centre Split, Croatia in 2013. *Anaerobe* 2015;31:31-6.

28. Wybo I, Van den Bossche D, Soetens O, Vekens E, Vandoorslaer K, Claeys G, et al. Fourth Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:155-61.
29. Hastey CJ, Boyd H, Schuetz AN, Anderson K, Citron DM, Dzink-Fox J, et al. Changes in the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from 2007-2009 to 2010-2012 based on the CLSI methodology. *Anaerobe* 2016;42:27-30.
30. Lee Y, Park YJ, Kim MN, Uh Y, Kim MS, Lee K. Multicenter study of antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in Korea in 2012. *Ann Lab Med* 2015;35:479-86.
31. Sherrard LJ, Graham KA, McGrath SJ, McIlreavey L, Hatch J, Muhlebach MS, et al. Antibiotic resistance in *Prevotella* species isolated from patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:2369-74.
32. Veloo AC, Seme K, Raangs E, Rurenga P, Singadji Z, Wekema-Mulder G, et al. Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:450-4.
33. Byun JH, Kim M, Lee Y, Lee K, Chong Y. Antimicrobial susceptibility patterns of anaerobic bacterial clinical isolates from 2014 to 2016, including recently named or renamed species. *Ann Lab Med* 2019;39:190-9.
34. Boyanova L, Kolarov R, Mitov I. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. *Anaerobe* 2015;31:4-10.
35. Huang YJ, LiPuma JJ. The microbiome in cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 2016;37:59-67.
36. Lynch SV, Bruce KD. The cystic fibrosis airway microbiome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3(3):a009738.