

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANAEROP BAKTERİLERİN TANIMLANMASINDA ÇEŞİTLİ  
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI VE BAZI  
ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DUYARLILIKLARIN  
ARAŞTIRILMASI**

**DR. SELİN UĞRAKLI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**KONYA 2020**



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANAEROP BAKTERİLERİN TANIMLANMASINDA ÇEŞİTLİ  
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI VE BAZI  
ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DUYARLILIKLARIN  
ARAŞTIRILMASI**

**DR. SELİN UĞRAKLI**

TEZ DANIŞMANI  
**Doç. Dr. METİN DOĞAN**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 171518012 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA 2020**

## **TEŞEKKÜR**

Eđitimim süresince yetiŐmemde emeği geçen N.E.Ü. Meram Tıp Fakóltesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı BaŐkanı saygıdeğer Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a

Asistanlığım süresince her konuda bilgi ve tecrübeler ile bana yol gösteren, hiçbir konuda yardımını esirgemeyen tez danıŐmanım Doç. Dr. Metin DOĞAN'a,

Deneyimlerinden ve bilgilerinden her daim faydalandığım Prof.Dr. Mehmet ÖZDEMİR, Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU ve Dr. Öğretim Üyesi Fatma ESENKAYA TAŐBENT hocalarıma,

Tezimi 171518012 no' lu proje ile destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' ne,

PaylaŐımlarıyla her zaman bana destek olan asistan arkadaŐlarıma, mikrobiyoloji laboratuvarımızın tüm teknisyen ve personeline en içten dileklerle teşekkür ederim.

Sevgi, sabır ve destekleri için sevgili eŐime ve kızıma;

Her daim varlığını yanımda hissettiğim anne ve babama minnet ve Őükranlarımı sunarım.

**Selin UĞRAKLI**

**2020**

## ÖZET

# ANAEROP BAKTERİLERİN TANIMLANMASINDA ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI VE BAZI ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DUYARLILIKLARIN ARAŞTIRILMASI

DR. SELİN UĞRAKLI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KONYA 2020

**Amaç:** Bu çalışmada hastanemizin değişik kliniklerinden anaerop enfeksiyon şüphesiyle laboratuvara kabul edilen klinik örneklerde anaerop bakterilerin izolasyonu, çeşitli yöntemlerle tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Mikrobiyoloji laboratuvarına anaerop enfeksiyon şüphesi ile kabul edilen 197 klinik örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Numunelerin hem aerop hem de anaerop ortam şartlarında ekimi yapılmıştır. Anaerop kültür için numunelerin % 5 defibrine koyun kanı ve vitamin K1 eklenmiş Scheadler besiyeri ve tiyoglikolatlı besiyerine ekimi yapılmıştır. Kan örnekleri Bactec Plus Anaerobic F şişelerine inoküle edilmiş ve otomatize sistemde inkübe edilmiştir. İzole edilen anaerop bakteriler konvansiyonel yöntemler, AnIdent Discs testleri, API 20A ve VITEK 2 ANC testleri kullanılarak identifiye edilmiştir. İzolatların penisilin G, sefoksitin, klindamisin, metronidazol, piperasilin / tazobaktam, imipenem, seftolozan / tazobaktam duyarlılıkları gradient difüzyon test metodu ile belirlenmiştir.

**Bulgular:** Çalışmaya alınan 197 klinik örnekten 46 anaerop bakteri izole edilmiştir. Bu çalışmada soyutlanan 46 anaerop izolatın % 69. 6' sını Gram pozitif anaeroplardan, %30,4 ünü Gram negatif anaerop bakteriler olarak belirlenmiştir. Gram negatif anaeroplardan en fazla *Prevotella* spp. (7) ve *B. fragilis* grup (5) izole edilmiştir. Gram pozitif anaeroplardan ise en sık *Peptostreptococcus* spp. (10), ikinci sıklıkta *Clostridium* spp. (9) soyutlanmıştır. İzolatların 43'ünde her iki sistemden en az biri ile identifikasyon sağlanmıştır. API 20A ile VITEK 2 ANC arası cins düzeyinde uyumluluk 35 / 44 (% 79. 5) oranında saptanırken; tür düzeyinde uyum % 54. 3 olarak tespit edilmiştir. En yüksek direnç penisiline (%38. 6) karşı bulunurken; sefoksitin, klindamisin, metronidazol, piperasilin/ tazobaktam ve imipenem duyarlılık oranları ise sırasıyla %93.2 ; % 65.9; % 84.1; % 93.2 ve %100 olarak bulunmuştur. Seftolozan tazobaktamın MİK değerinin bakteri türüne göre geniş bir aralıkta (0.032-12 mg /L) değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Seftolozan/ tazobaktamın MİK<sub>50</sub> değeri 2 mg / L olarak saptanmıştır.

**Sonuç:** Bu çalışmada API 20A panel ve VITEK 2 ANC yarı otomatize ticari sistemlerinin anaerop bakteri identifikasyonu konusundaki performansları ve konvansiyonel yöntemlerle uyumunun değerlendirilmesi hedeflenmiştir. API 20A'nın Gram negatif anaerop basillerin tanımlanmasında VITEK 2 ANC karta göre konvansiyonel yöntemlerle daha fazla uyum gösterdiği tespit edilmiştir. Öte yandan Vitek 2 ANC yarı otomatize sistemi ise rutin laboratuvar iş akışı içinde uygulayabilme ve pratiklik imkanları sağlamaktadır. Çalışmamızda yüksek oranda penisilin ve klindamisin direnci görüldüğünden ampirik tedavide bu antibiyotikler tercih edilmemelidir. Sonuçlarımıza göre sefoksitin ve metronidazol ampirik tedavide tercih edilebilir ancak antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması daha uygun olacaktır. Bu çalışmada yeni antibiyotiklerden seftolozan tazobaktamın anaerop bakteriler üzerindeki etkinliğinin saptanması hedeflenmiştir. Seftolozan tazobaktamın

MİK değerinin bakteri turlerine göre değişkenlik göstermesi sebebiyle; bu antibiyotiğin anaerop bakteriler üzerindeki etkisini belirleyebilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** Anaerop bakteri, antibiyotik duyarlılık, direnç



## ABSTRACT

### Comparison of Various Methods for Identification of Anaerobic Bacteria and Investigation of Sensitivities to Some Antibiotics

DR. SELİN UĞRAKLI  
Thesis of Medical Specialty  
KONYA 2020

**Objective:** In this study, it was aimed to isolate, identify and determine antibiotics susceptibility profiles of anaerobic bacteria by handling 197 clinical samples from our clinics with suspicion of anaerobe infection.

**Materials and methods:** 46 anaerobic bacteria were isolated from 197 clinical samples included in the study. In this study, 69.9% of 46 isolated anaerobic isolates were Gram positive anaerobes and 30.4% were Gram negative anaerobes. Of Gram negative anaerobes, most *Prevotella* spp. (7) and *B.fragilis* group (5) were isolated. The most common of Gram positive anaerobes is *Peptostreptococcus* spp. (10), second *Clostridium* spp. (9) isolated. Identification was provided with at least one of both systems in 43 of the isolates. Genus level compatibility between API 20A and VITEK 2 ANC was determined as 35/44 (79.5%); species level compliance was determined as 54.3%

While the highest resistance is found against penicillin; The sensitivity rates of ceftoxitin, clindamycin, metronidazole, piperacillin / tazobactam and imipenem were 93.2%, 65.9%, 84.1%, 93.2% and 100% respectively. We found that the MIC value of ceftolosing tazobactam varies widely in a wide range (0.032-12 mg / L) depending on the bacterial species. The MIC<sub>50</sub> value was determined as 2 mg / L.

**Conclusion:** In this study, it is aimed to evaluate the performance of API 20A panel and VITEK 2 ANC semi-automated commercial systems on anaerobic bacteria identification and their compatibility with conventional methods. It has been determined that API 20A is more compatible with VITEK 2 ANC card than conventional methods in determining Gram negative anaerobic bacilli. On the other hand, Vitek 2 ANC semi-automated systems provide practical and practical possibilities in routine laboratory workflow. In our study, these antibiotics should not be preferred in empirical treatment since high rate of penicillin and clindamycin resistance are seen. According to our results, ceftoxitin and metranidazole may be preferred in empirical treatment, but antibiotic susceptibility tests will be more appropriate. In this study, it was aimed to determine the effectiveness of ceftolosan tazobactam, which is one of the new antibiotics, on anaerobic bacteria. Since the MIC value of ceftolosan tazobactam varies according to bacterial species; more studies are needed to determine the effect of this antibiotic on anaerobic bacteria

**Keywords:** Anaerop bacteria, antibiotic susceptibility, resistance

## İÇİNDEKİLER

<b>Sayfa</b> TEŞEKKÜR.....	III
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
RESİMLER DİZİNİ.....	X
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	XI
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Anaerop Bakterilerin Tarihçesi.....	3
2.2. Oksijen İhtiyacına Göre Bakteriler.....	4
2.3. Anaerop bakterilerin sınıflandırılması.....	6
2.4. Anaerop bakterilerin insan florasındaki dağılımı ve önemi.....	9
2.5. Anaerop bakteriyoloji Laboratuvarlarında Maliyet-Performans Değerlendirilmesi.....	11
2.6. Anaerop bakterilerin Patojenitesi ve Virülans Faktörleri.....	11
2.7. Anaerop enfeksiyon şüphesi düşündüren durumlar.....	15
2.8. Anaerop Bakterilerin Sebep Olduğu Enfeksiyonlar.....	16
2.9. Anaerop Kültür İçin Örnek alımı, Seçimi ve Nakli.....	18
2.9.1. Örneğin Seçimi.....	18
2.9.2. Örneğin Alınması.....	19
2.9.3. Örneğin Nakli.....	20
2.10. Anaerobik Kültürde Kullanılan Besiyerleri ve Besiyeri Seçimi.....	21
2.10.1. Selektif Olmayan Genel Üretim Agar Besiyerleri.....	22
2.10.2.1. <i>Bacteroides</i> Safra Eskülin (BBE) Agar.....	22
2.10.2.2. Kanamisin-Vankomisin (KV) Hemolize Kanlı Agar.....	22
2.10.2.3. Yumurta Sarılı Agar (Egg Yolk Agar-EYA).....	23
2.10.2.4. Feniletıl alkol koyun kanlı agar (PEA).....	23
2.10.2.5. Kolistin nalidiksik asit kanlı agar.....	23
2.10.2.6. Sikloserin-Sefoksitin-Fruktoz Agar (CCFA).....	23
2.10.3. Geri Dönüş Sıvısı.....	23
2.11. Anaerop İnkübasyon Sistemleri ve İnkübasyon Koşulları.....	24
2.11.1. Anaerop Kabinler (Anaerobic chamber, Anaerobic glove box ).....	24
2.11.2. Anaerop Jar tekniği.....	24
2.11.3. Anaerop plastik poşetler.....	24
2.11.4. Roll Tüp Sistemi.....	25
2.12. Örneklerin İşlenmesindeki Basamaklar.....	25

2.12.1. Materyalin Makroskopik İncelenmesi.....	25
2.12.2. Örneklerin Ekim İçin Hazırlanması.....	25
2.12.3. Örneğin Mikroskopik İncelenmesi (Gram Boyama).....	25
2.12.4. Örneğin Ekimi ve İzolasyon Basamakları.....	27
2.12.5. Kültürlerin Değerlendirilmesi.....	28
2.12.6. Anaerop Bakterilerin Tanımlanması.....	30
2.12.6.1. Seviye 1 Tanımlama.....	30
2.12.6.2. Seviye 2 Tanımlama.....	32
2.12.6.3. Seviye 3 Tanımlama.....	32
2.12.7. Anaerop bakteriler antibiyotik duyarlılık testleri.....	33
2.12.7.1. Agar dilüsyon Metodu.....	33
2.12.7.2. Sıvı Mikrodilüsyon Metodu.....	34
2.12.7.3. Gradyent Test Metodu.....	34
2.13. Anaerobik Enfeksiyonlarda Tedaviler.....	35
2.13.1 Anaerobik Enfeksiyonlarda Tedavi Yönetimi Prensipleri.....	35
2.13.2. Anaerop Bakterilerde Antibiyotik Direnci.....	39
2.13.2.1. Beta-laktam antibiyotik direnci.....	39
2.13.2.2. Metranidazol direnci.....	41
2.13.2.3. Klindamisin Direnci.....	42
2.13.2.4. Florokinolon direnci.....	42
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>43</b>
3.1. Kültür.....	43
3.2.İzole Edilen Anaerop Bakterilerin Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi ve Tanımlanması İçin Yapılan İşlemler.....	46
3.3. İzole edilen anaerop bakterilerde antimikrobiyal direncin belirlenmesi.....	50
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>52</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>58</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>68</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>69</b>

## TABLolar

**Tablo 1.1.** Önceden *Peptostreptococcus* Cinsinde Olan Önemli Anaerobik Kokların Yeni Sınıflaması.

**Tablo 1.2.** Oral floradaki anaerob bakteriler.

**Tablo 1.3.** Gastrointestinal kanaldaki anaerob bakteriler.

**Tablo 1.4.** Genito-üriner sistem florasındaki anaerob bakteriler.

**Tablo 1.5.** Anaerob enfeksiyona zemin hazırlayan durumlar.

**Tablo 1.6.** Anaerob Gram negatif bakterilerin virulans faktörleri.

**Tablo 1.7.** İnsan Hastalıkları ile İlişkili Clostridium Türleri\*.

**Tablo 1.8.** Kaynağına Göre Anaerobik Enfeksiyonlar .

**Tablo 1.9.** Çeşitli enfeksiyonlarda görece anaerob enfeksiyon olma yüzdeleri.

**Tablo 2.** Çeşitli enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilen bakteriler.

**Tablo 2.1.** Anaerobik Bakteriyolojik Çalışmalar İçin Örnek Alımı .

**Tablo 2.2.** Anaerob kültür çalışmalarında kullanılan besiyerleri .

**Tablo 2.3.** Anaerob bakterilerin Gram boyanma özelliklerine göre ön tanısı.

**Tablo 2.4.** Anaerob Bakterilerin Koloni Morfoloji Özelliklerine Göre Olası Etken.

**Tablo 2.5.** Anaerob Antibiyotik duyarlılık testi yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.

**Tablo 3.0** Antibiyotik tanı diskleri ile anaerob bakterilerde ön identifikasyon.

**Tablo 3.1.** Çalışmamızda kullanılan E test striplerinin MİK aralıkları, kodları ve üretici firma bilgileri.

**Tablo 3.2.** Üretici firmanın önerdiği (EUCAST veya CLSI'a göre) klinik sınır değerler.

**Tablo 4.1.** Çalışmaya alınan klinik örneklerin türü ve üretilen anaerob bakterilerin bu örneklere göre dağılımı.

**Tablo 4.2.** Çalışmamızda İzole edilen anaerob bakterilerin API 20A ve Vitek 2 ANC sistem ile identifikasyonuna ait karşılaştırılmalı sonuçları.

**Tablo 4.3.** API 20A ve Vitek ANC ile cins düzeyinde uyumsuzluk saptanan izolatlarla ilişkin sonuçların geleneksel yöntem ile uyumu.

**Tablo 4.4.** Tanımlanan anaerob bakterilerin antimikrobik duyarlılık oranları.

**Tablo 4.5.** Tanımlanan anaerob bakterilerin Gram boyanma özelliklerine göre gruplamada antimikrobik duyarlılık oranları

## RESİMLER

**Resim 1.a.** Periton sıvı örneği, Gram negatif fuziform basil.

**Resim 1.b.** Derin doku örneği, Pleomorfik uzun Gram negatif basiller, Gram pozitif kok ve lökosit.

**Resim 2.a.** Gram pozitif dallanan, basil yapısı.

**Resim 2.b.** Gram pozitif basil morfolojisi.

**Resim 2.c.** Anaerop üreme gözlenen plaktan Gram boyama Gram pozitif dallanan basil ( Çalışmamızdan *Actinomyces odontolyticus'* a ait).

**Resim 2.d.** Siyah -Kahverengi pigmente, küçük yuvarlak koloniler (Çalışmamızdan; *Prevotella* spp.'ye ait Scheadler agar koloni görüntüsü).

**Resim 2.e.** Koyu sarı renkli, düzensiz sınırlı, kabarık koloni yapısı (Çalışmamızdan; *Clostridium tertium* kolonisine ait görüntü).

**Resim 2.f.** *Bacteroides ovatus / thetaiotaomicron (Bacteroides fragilis grup).*

**Resim 3.0.** Genbag (Biomeriux, Fransa) içi anaerop ortamın rezasurin (Oxoid, UK) adı verilen indikatör strip ile denetimin yapılması; strip testteki maviden beyaz renge olan değişim anaerop ortam şartların sağlandığına işaret etmektedir (Çalışmamızdan).

**Resim 3.1.** Ana plaktan E-test ve identifikasyon diskleri ile tanımlama için saflaştırma pasajı yapılmış *Actinomyces meyeri / odontolyticus'* ye ait görüntü (10 günlük inkübasyonu sonrası alınan fotoğraf- tuğla kırmızısı koloniler.

**Resim 3.2.** Scheadler agardaki *Clostridium* spp. görüntüsü ve AnIDENT (Oxoid) diskler ile ön identifikasyonu.

**Resim 3.3.** İzole edilen *Bacteroides fragilis* suşu; Solda BEA'da eskülin hidrolizine bağlı siyah renk değişimi; sağda antibiyotik tanı diskleri ile *B.fragilis'* in tanımlanması (Çalışmamızdan).

**Resim 3.4.** Antibiyotik tanı diskleriyle Gram pozitif kok olarak ön raporlanmış, *Fingoldia magna* izolatu (Çalışmamızdan).

**Resim 3.5.** İzole edilen *B.fragilis'* in API 20 A'da çeşitli biyokimyasal özellikleri gösterilmiştir.

**Resim 3.6.** Aynı kolonin E test ile antibiyotik duyarlılık testi (*A. meyeri / odontolyticus*)

## ŞEKİLLER

**Şekil 1.** Çalışmaya alınan örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımları.

## KISALTMALAR VE SİMGELER

CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
UV	: Ultraviole
KV	:Kanamisin-vankomisin hemolize kanlı agar
µg/ml	:Mikrogram/mililitre
BBE	:Bacteroides safra eskülin (bile esculin) agar
H <sub>2</sub> S	:Hidrojen sülfür
PEA	:Fenil-etil alkollü agar
THIO	:Tiyoglikolat
N <sub>2</sub>	:Azot
H <sub>2</sub>	:Hidrojen
°C	:Santigrat derece
mg/L	:Miligram/ litre
EUCAST	: Avrupa Antibiyotik Duyarlılık Komitesi
FDA	:Food and Drug Administration
CLSI	:Clinical and Laboratory Standards Institute
MİK	:Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
cm <sup>3</sup>	:Santrimetreküp
BFG	: <i>Bacteroides fragilis</i> grubu
E-test	: Epsilon Test
IP	:İmipenem

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Anaerop bakteriler, endojen mikrofloranın önemli bir üyesi olarak vücudumuzun çeşitli anatomik bölgelerinde değişen oranlarda bulunur. Bu mikroorganizmalar fırsatçı patojenler olup; genellikle kolonize oldukları yerlerde endojen kaynaklı enfeksiyonlara neden olur (Jousimies-Somer HR ve ark. 2002; Nagy ve ark. 2018). İlişkili olduğu durumlar, lokalize abseden hayatı tehdit eden enfeksiyonlara kadar geniş bir aralıkta değişim göstermektedir (Noor ve ark. 2020).

Normal cilt ve mukozal membranlarda endojen olarak bulunan bu bakteriler; cerrahi, travma gibi doku bütünlüğünün bozulduğu durumlar ile malignite ve diyabet gibi immün süprese hastalarda diğer fakültatif anaerop bakterilerle birlikte enfeksiyon etkeni olabilmektedir. Anaerop bakteriler sahip oldukları virülans faktörleri sayesinde; intraabdominal, obstetrik- jinekolojik, yumuşak doku ve diyabetik ayak enfeksiyonlarına yol açabilmektedir ( Aldridge ve ark. 2003; Claros ve ark. 2013).

Bu bakteriler pek az durumda ekzojen kaynaklı enfeksiyonlara sebep olur. Ekzojen kaynaklı anaerobik enfeksiyonlardan baskın olarak Gram-pozitif sporlu basiller sorumlu tutulmaktadır ( Ör; *Clostridium* spp.). Özellikle Gram pozitif sporlular olmak üzere, bu bakteriler salgıladıkları toksinler aracılığı ile viseral gazlı gangren, tetanoz, miyonekroz ve botulismus gibi toksinlerin de etkili olduğu enfeksiyonlara yol açmaktadırlar. Sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon etkenlerinden olan *Clostridioides difficile*'ye bağlı ishal ve kolit olgularında patojen, ekzojen olarak hastane ortamından edinilmekte ya da duyarlı konağa verilen antibiyotiklerle kolon mikrobiyotası değişimi sonucunda *C. difficile* baskın hale gelip, değişen oranlarda hastalık tablosuna neden olmaktadır (Kumar ve ark. 2019).

Anaerop bakteri cins ve türleri oksijene değişen oranlarda duyarlılık göstermektedir. Bu yüzden şüpheli enfeksiyonlarda örnek alımı ve örneğin laboratuvara transportundan ekim yöntemine kadar özel koşullara gereksinim duyulmaktadır. Bu şartlara gerekli hassasiyet gösterilemediğinden dolayı bu bakterilerin laboratuvar izolasyonlarında başarısızlığa düşülmekte ve anaerobik enfeksiyonlar sıklıkla gözden kaçırılmaktadır (Cobo ve ark. 2019).

Anaerop bakterilerin çoğu fakültatif ya da aerop bakterilerden daha yavaş üreme göstermekte ve özel ortamlara ihtiyaç duymaktadır. Bu bakterilerin etken

olduğu klinik örneklerde çoğu zaman kompleks polimikrobiyal üreme görölmektedir. Bu sebeple anaerop enfeksiyon etkeninin saf olarak izole edilmesi güç olup zaman alıcı mikrobiyolojik çalışmalar gerektirir. İnvitro antibiyotik duyarlılık çalışmaları rutinde genellikle yapılmamaktadır. Anaerobik enfeksiyon şüphesinde, klinisyen tedaviyi ampirik olarak düzenlemekte ve bu tedaviler genellikle anaerop bakterilere etkinliği olan bir ajan içermektedir (Goldstein and Citron 2011; Schuetz 2014 ).

Dünya genelinde, klinik olarak önemli enfeksiyonlar oluşturan anaerop bakteriler arasında bazı kritik antibiyotiklere karşı önemli oranda direnç geliştirdiği bildirilmiştir. Bu direnç oranları bölgelere, merkezlere, hatta aynı merkezde kliniklere göre ve enfeksiyon etkeninin türüne göre değişiklik göstermektedir (Veloo ve ark. 2020).

Anaerop bakterilerin etken olduğu enfeksiyonlarla mücadelede, enfeksiyon yerine göre, bölge ve kliniklere göre etkenlerin bilinmesi, etkenin tanımlanması için uygun stratejilerin geliştirlmesi ve antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi özellikle ampirik tedavinin geliştirlmesi açısından önemli bir aşama olup gereksiz ve yanlış antibiyotik kullanımlarının önüne geçilmesi bakımından en önemli aşamalardır. Anaerop bakteri enfeksiyonu düşünölen durumlarda sıklıkla etken izole edilemediğinden ampirik tedavinin değerli olduğu unutulmamalıdır. Antibiyotiklere direncin arttığı da dikkate alındığında, özellikle laboratuvarların etkenin izolasyonu konusunda etkin yöntemler geliştirmesi ve belirli bir sıklıkla antibiyotik direnç profillerini belirlemesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yaklaşımlar akılcı antibiyotik kullanım uygulamalarına katkı sağlayacaktır (Claros ve ark. 2013; Nagy ve ark. 2018).

Bu çalışmada hastanemizin merkez mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olabilecek anaerop bakterilerin izolasyonu, tanımlamada kullanılan çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması ve gradiyent test yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Anaerop Bakterilerin Tarihçesi

İnsanoğlu canlılığın sürdürülebilirliği için havanın mutlak gerekli olduğunu düşünmüştür. Pek çok canlı için vazgeçilmez olan havadaki oksijen anaerop bakteriler için toksik etkiler göstermektedir (Gajdács ve ark. 2017).

Anaerobik bakteriler hakkındaki bilinenler, son yılların ürünüymüş gibi görünse de; bu canlılar hakkındaki veriler Hippokratın tetanoz hastalığını MÖ 4. yüzyılda tanımlamasına dayanmaktadır. MS 4. yüzyıla gelindiğinde Xenophon, Yunan askerlerinde akut nekrotizan ülsetatif gingivitisi tarif etmiştir (Finegold SM 1993).

Anaerop bakterilerin mikroskop altında incelenmesi ve kültürde üretilmesi bu gelişmelerden yüzyıllar sonra gerçekleşmiştir. İlk olarak 17. yüzyılda Antonie Von Leewenhock geliştirdiği mikroskopla havasız ortamda yaşayabilen “animalcules” adını verdiği canlılardan bahsetmiştir (Finegold SM 1993).

Anaerobiosis kavramı Pasteur’ un yaptığı çalışmalarla açığa kavuşmuştur. 1860 ‘lı yıllarda mikroskop altında ıslak preperattaki canlıların hava ile temasında motilitelerini kaybettiklerini saptamış; bu canlılar için bugünkü “anaerobes” tanımının orjini olan “anaerobies” kavramını ortaya koymuştur. 1861 yılında *Vibrion butyrique* (*Clostridium butyriqum*) Pasteur tarafından keşfedilmiştir. Pasteur 1877 yılında Joubert ile birlikte yürüttüğü çalışma ile *Clostridium septicum* (*Vibrion septicum*)’u üretmiştir ( Finegold SM 1993).

1800 ‘lü yılların sonlarında Veillon ve Zuber tarafında anaerop bakterilerin kötü kokulu cerahatlı yaralar ve çeşitli infeksiyonlar ile ilişkili olduğu fikri ortaya konmuştur. 1960’lı yıllara kadar *Clostridium* türleri anaerop bakteriler arasında çalışmaların en fazla yoğunlaştığı grup olmuştur (Kıyan 1999).

Günümüzdeki teknolojik gelişmelerle birlikte, yeni anaerop bakteriler türlerinin keşfinde, antimikrobiyal direncin ve virülans özelliklerinin tanımlanmasında diğer yöntemlere ilaveten moleküler yöntemlerin de kullanılması üzerine yapılan çalışmalar dikkati çekmektedir ( Song 2005; Kozlov 2018).

## 2.2. Oksijen İhtiyacına Göre Bakteriler

Bakteriler, başlıca aerobik, anaerobik ya da fakültatif anaerobik solunum ile kendileri için gerekli enerjiyi üretmektedirler. Aerobik solunumda terminal hidrojen alıcısı havadaki oksijendir. Anaerob bakteriler son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanamazlar ve enerji eldesi için fermentasyon yöntemini kullanırlar. Anaerob bakterilerin son hidrojen alıcısı N, S, ve C gibi molekülleri kullanarak NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, CH<sub>4</sub> gibi ürünler oluşturan maddelerdir (Bilgehan 2009). Oksijen anaerobik bakteriler üzerinde değişen oranlarda toksik etkiye sahiptir.

Bakteriler karbondioksit ve oksijenle olan ilişkilerine göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Bilgehan 2009; Kıyan 2006; Winn ve ark. 2006) :

1. **Zorunlu aeroplalar:** Sadece atmosfer havasında üreyebilen bakterilerdir.

Bu tip bakteriler oksijensiz ortamda ya hiç üremezler ya da çok az üreme gösterirler.

(Örnek olarak: *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Mycobacterium tuberculosis* cinslerinin üyeleri)

2. **Mikroaerofilik bakteriler:** Bu gruptaki bakteriler atmosfer havasında (%21 O<sub>2</sub>) inkübe edildiklerinde üremezken; tamamen anaerob ortamdaki inkübasyonları sonrasında minimal olarak ürerler. Bu gruptaki bakteriler için optimum üreme şartları % 5 O<sub>2</sub>, % 10 CO<sub>2</sub> ve % 85 N<sub>2</sub>'li ortamlardır (Ör: *Campylobacter jejuni*, *Brucella abortus*) ( Kempf ve ark. 2017).

3. **Fakültatif anaerob bakteriler:** Hem oksijeni terminal elektron alıcısı olarak kullanabilirler, hem de oksijen olmadığı durumlarda fermentasyon ile enerji elde edebilirler. Hem oksijenli hem de oksijensiz ortamda üreyebilirler. Ancak oksijenli ortamda daha fazla enerji üretebildiklerinden dolayı oksijenli ortamda daha iyi üreme gösterirler. Enerji üretimi sırasında ortaya çıkan toksik hidrojen peroksit ve süperoksit radikallerini uzaklaştırabilen katalaz ve süperoksit dismutaz enzimlerine sahiptirler (Ör: *E.coli*, *S.aureus*, *Klebsiella* spp.).

4. **Anaerob bakteriler:** Anaerob bakteriler aerotoleran ve zorunlu anaerob bakteriler olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar.

A. **Aerotoleran anaeroplalar:** Atmosfer havasında ve % 5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda zayıf bir üreme gösterirken; anaerob ortam sağlandığında üremeleri belirgin oranda

artan bakterilerdir. ( Ör: *Clostridium histolyticum*, *Clostridium tertium* ) (Tünger ve ark. 2003).

**B. Zorunlu anaeroplara:** Oksijen varlığındaki üreme durumlarına ve oksijene tolerans durumuna göre iki gruba ayrılırlar:

**a. Kesin (Kati)-zorunlu anaeroplara:** Besiyeri üzerindeki oksijen düzeyi % 0,5' in üzerine çıktığında yaşayamazlar. (Ör: *Clostridium haemolyticum*, *C.novyi*, *Treponema denticola*) (Aydın, 2004)

**b. Orta derecede (ılıman) - zorunlu anaeroplara:** Besiyeri yüzeyindeki oksijen düzeyi % 3'e kadar yaşayabilen anaerop bakterilerdir (*Bacteriodes fragilis*, *Fusobacterium nucleatum* ). Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en çok üretilen anaerop bakteri türleri bu gruptadır.

Anaerop bakterilerin üremesinde etkili aşağıda belirtilen iki faktör çok önemlidir:

1.Ortamda bulunan oksijen ve hidrojen gazlarının konsantrasyon düzeylerinin uygun olması

2. Ortamın oksidasyon-redüksiyon potansiyeli ( redoks potansiyeli = Eh ) ve ortamın ph'sının uygun olması gerekir

Anaerop bakteriler üzerinde oksijenden daha toksijenik olan oksijen radikalleridir. Son elektron alıcısı olarak oksijenin kullanıldığı reaksiyonlarda süperoksit anyonları, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri oluşmaktadır. Aerop bakteriler sahip oldukları süper oksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz enzimleri ile bu serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunurlar. Kesin (kati) - zorunlu anaerop bakteriler ise bu enzimler ya hiç yoktur ya da çok düşük düzeylerde üretilmektedir. Maalesef ki insanda hastalık yapan orta derecede (ılıman ) anaerop bakterilerdir ve bu bakteriler düşük düzeyde de olsa katalaz ve süper oksit dismutaz üretebildiklerine dair bilgiler yer almaktadır (Tally ve ark.1997; Harvey ve ark. 2018).

Süper oksit dismutaz enzimi oksijen radikallerini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür. Hidrojen peroksit ise katalaz enzimi ile su ve hidrojene parçalar. Böylelikle biyolojik olarak son derece aktif olan oksijen radikalleri ortamdan uzaklaştırılmış olur (McCord ve ark. 1971; Engelkırk ve ark, 1992; Schatzman ve Culotta 2018).

Ortamdaki oksijen konsantrasyon seviyesi arttıkça anaerop bakteriler üzerinde iki kademeli hasar meydana gelir. Faz 1 (bakteriostatik) de anaerop bakteri üremesinde yavaşlama ve durma meydana gelir. Bu aşama geri dönüşlüdür. Ancak ortamdaki oksijen konsantrasyonunda artış devam ederse irreversible dönem olan Faz 2 (bakterisidal)’a geçilir. Bu dönemde bakteriler canlılığını yitirir (Kıyan 1999)

Anaerop bakterilerin üremesini etkileyen bir diğer parametre ise ortamın oksidasyon-redüksiyon(redoks) potansiyelidir. Elektronların bir bileşikten diğerine aktarılması sırasında iki bileşik arasında oluşan potansiyel fark; redoks potansiyelidir ve “Eh” ile gösterilir. Elektron kazanılmasına redüksiyon; elektron kaybedilmesine oksidasyon denir. Ortamdaki oksidasyon şiddeti yüksek Eh değerlerini; redüksiyon şiddeti ise düşük Eh değerini verir ( Kıyan 1999; Bilgehan 2002; Winn ve ark. 2006).

Anaerop bakteriler üremek için düşük Eh değerlerindeki ortamlara ihtiyaç duyarlar. Bu sebeple besiyeri ortamına sistein ve sodyum tiyoglikolat gibi güçlü redüktan özelliğe sahip maddeler eklenir. Bu amaçla hayvansal gıdalardaki sistein gibi –SH grubunu içeren aminoasitler (et parçaları, kıyma, balık eti ) indirgen şekerler, askorbik asit, bazı demir bileşikleri de redüktan madde olarak kullanılabilir. Bu redüktan maddelerin besiyeri ortamına eklenmesi ile çözünmüş oksijenin bağlanarak ortamdaki uzaklaştırılması da sağlanır ( Strohl ve ark. 2001)

### **2.3. Anaerop Bakterilerin Sınıflandırılması**

Klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin Gram boyanma ve morfolojik özelliklerine göre cins düzeyindeki sınıflaması şu şekildedir (Song ve Finegold 2011; Harvey ve ark. 2018; Brook ve ark. 2018).

#### **1. Gram pozitif koklar**

- *Peptococcus*
- *Finigoldia*
- *Peptostreptococcus*
- *Parvimonas*
- *Anaerococcus*
- *Peptoniphilus*
- *Gallicola*

- *Murdochiella*
- *Atopobium*
- *Coprococcus*
- *Anaerosphaera*
- *Sarcina,*
- *Blautia*

## **2. Gram negatif koklar**

- *Veillonella*
- *Acidominococcus*
- *Megasphaera*
- *Negativococcus*
- *Anaeroglobus*

## **3. Gram pozitif basiller**

### **a. Sporlu Gram pozitif basiller**

- *Clostridium*
- *Filifactor*

### **b. Sporsuz Gram pozitif basiller**

- *Eggerthella*
- *Actinomyces türleri*
- *Eubacterium türleri*
- *Propionibacterium türleri*
- *Laktobacillus türleri*
- *Atopobium türleri*
- *Bifidobacterium dentium*
- *Mobilincus türleri*
- *Propionibacterium türleri*
- *Bulleida*

## **4. Gram negatif basiller**

- *Bacteroides*
- *Fusobacterium*

- *Prevotella*
- *Porphyromonas*
- *Bilophila*
- *Selenomonas*
- *Dialister*

Günümüzde DNA teknolojilerinin kullanımı ( DNA'daki guanin + sitozin içeriğinin saptanması, ribozomal RNA homolojisi, jel elektroforezis, dizi analizi, tüm genom analizi vb.) ve kemotaksonamik analizlerin (peptidoglikan analizi, gaz-likid kromatografi ile yağ asitlerinin ölçümü) yaygınlaşması ile anaerob bakteriler arasındaki taksonamik ilişkilerin anlaşılması kolaylaşmıştır.

Geniş çaptaki taksonomik değişiklikler en çok *Bacteroides* türlerini ve Gram pozitif anaerob kokları etkilemiştir (**Tablo 1.1.**) (Murray ve ark. 2016). 1977 yılına kadar tek tür olarak bilinen *Bacteroides melaninogenicus* şimdi iki cinsi (*Prevotella* ve *Porphyromonas*) ve 15'ten fazla türü kapsamaktadır. Gram pozitif basillerde minör değişiklikler olmuşken; *Eubacterium* cinsi heterojen bir grup olma özelliğini korumaktadır (Brook ve ark. 2018).

Genel bir ifade ile moleküler tekniklerini laboratuvarlarımızda yaygınlaşması ile bakterilerin sınıflamasında değişikliklere gidilmiş; bazen taksonomik ilişkiler kuvvetlenirken; bazende zayıf ilişkiler saptanan gruplar ayrılmış yeni bir taksonda kendine yer bulmuştur. Tüm bu gelişmeler var olan biyolojik çeşitliliği arttırmaktadır (Finegold 2004; Munson ve ark. 2017).

**Tablo1.1.** Önceden *Peptostreptococcus* Cinsinde Olan Önemli Anaerob Kokların Yeni Sınıflaması.

Önceki Sınıflama	Yeni Sınıflaması
<i>P.anaerobius</i>	Değişiklik yok
<i>P.asaccharolyticus</i>	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>
<i>P.magnus</i>	<i>Finegoldia magna</i>
<i>P.micros</i>	Değişiklik yok
<i>P.parvulus</i>	<i>Atopobium parvulum</i>
<i>P. prevotii</i>	<i>Anaerococcus prevotii</i>

## 2.4. Anaerop Bakterilerin İnsan Florasındaki Dağılımı Ve Önemi

Anaerop bakteriler normail insan endojen florasının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Mukoz membranlarımız da dahil pek çok alanda kolonize bu bakteriler; konak savunmasının da önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Bu komponentlerdeki değişim patojen bakterilerin predominant hale gelmesine sebep olmaktadır.

İnsan mikroflorasında anaerop bakteriler özellikle oral kavite, intestinal kanal ve kadın genital sistemlerdeki mukozal yüzeyler ile deri de kolonize olmaktadır. Anaerop bakterilerin endojen kaynaklı enfeksiyonlara sebep olduğu bilinmektedir. Bu sebeple mikrofloradaki bölgelere göre anaerop cins ve türlerin bilinmesi anaerop enfeksiyon etkenlerinin yorumlanmasını da kolaylaştıracaktır ( Jousimies-Somer ve ark. 2002).

Anaerop bakterilerle kolonizasyon oral flora için doğum ile birlikte başlar ve yaşla beraber çeşitliliği artar. Burda kolonize olan bakterilerden *Prevotella dentalis* özellikle diş kökü iltihabından; *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* ve *Campylobacter rectus* erişkin periodontitis enfeksiyonlarından sorumlu tutulmuştur.

Gastrointestinal sistem florasını incelediğimizde; mide öz suyunda bakteri kolonizasyon oldukça düşük seviyelerde bulunmuş (100 organizma / ml ). Ancak aklorhidri gibi gastrik ph'nın yükseldiği hastalıklarda bakteri seviyesi  $10^6$ - $10^7$  / ml'ye yükselmiştir Yine gastrik ülser, peptik ülser, gastrik karsinoma durumlarında hem kolonize olan anaerop bakteri sayısında hem de çeşitliliğinde artış olmaktadır (Drasar ve ark. 1975; Stojanović ve ark. 2014).

İleumun üst kısmı normal şartlarda seyrek bir floraya sahiptir. Ancak distal ileumda kolnize koliform ve anaerop bakterilerin kolonizasyonu artmakta bakteri miktarı  $10^4$ - $10^6$  / ml'yi bulmaktadır (Drasar ve ark. 1975; Harvey ve ark. 2018).

Kolonik flora, ince bağırsak florasından fazla ve çeşitlilik arz eder. Distal kolondaki bakteri miktarı ( $10^{11}$ - $10^{12}$  ) ve anaerop /aerop bakteri oranı (1000 / 1 ) en fazladır (Finegold SM ve ark. 1983; Jousimies-Somer ve ark. 2002; Harvey ve ark. 2018). Kültüre edilebilir kolon florasıda *B. fragilis grubu* bakteriler dominant olarak bulunmaktadır. *B. fragilis* grubu bakteriler içinde ise *Bacteroides thetaiotaomicron* normal flora ile en çok ilişkili olan türdür.

Kadın genital kanalda baskın olan *Lactobacillus* türleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üreterek konak savunmasında görev alırken; kolonize haldeki diğer anaerop bakteriler ile de denge halindedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üreten *Lactobacillus* türlerinin yokluğunda; *Mobilincus*, *Gardnerella vaginalis* ile beraber bazı *Prevotella*, *Porphyromonas* ve *Peptostreptococcus* türleri bakteriyal vajinozis kompleks'e dahil olur. Bu patojenler; preterm doğum, koriyoamnionit, postpartum endometrit ve pelvik inflamatuvar hastalık gibi birçok hayatı tehdit eden enfeksiyona sebep olabilirler (Eschenbach 1993; Liu ve ark. 2019).

İnsan normal florasındaki anaerop bakterilerin buldukları vücut bölgelerine göre dağılımları **Tablo 1.2.**, **Tablo 1.3.** ve **Tablo 1.4.**' te verilmiştir (Mihato ve ark. 2011; Procop ve ark. 2017).

<b>Tablo 1.2.</b> Oral floradaki anaerop bakteriler.	
<b>Gram pozitif koklar</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Parvimonas</i></li> <li>• <i>Peptostreptococcus</i></li> </ul>	<b>Gram negatif kok</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Veillonella</i></li> </ul>
<b>Gram pozitif basiller</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Actinomyces</i></li> <li>• <i>Bifidobacterium</i></li> <li>• <i>Eubacterium</i></li> <li>• <i>Mogibacterium</i></li> <li>• <i>Slackia</i></li> <li>• <i>Scardovia</i></li> <li>• <i>Parascardovia</i></li> <li>• <i>Olsenella</i></li> </ul>	<b>Gram negatif basiller</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pigmentsiz <i>Prevotella</i></li> <li>• Pigmentli <i>Prevotella</i></li> <li>• <i>Porphyromonas</i></li> <li>• <i>Fusobacterium</i></li> <li>• <i>Leptotrichia</i></li> <li>• <i>Selenomons</i></li> <li>• <i>Desulfovibrio</i></li> </ul>

<b>Tablo 1.3.</b> Gastrointestinal kanaldaki anaerop bakteriler.
<b>Mide ve İnce bağırsak (proksimal kısmı)</b> <i>Lactobacillus</i> spp.
<b>Kalın bağırsak ve (terminal ileum)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Gram negatif anaerop basiller</b>  <i>Bacteroides</i>, <i>Parabacteroides</i>, <i>Mitsuokella</i>, <i>Fusobacterium</i>, <i>Porphyromonas</i>, <i>Prevotella</i>, <i>Desulfovibrio</i>, <i>Leptotrichia</i></li> <li>• <b>Gram pozitif anaerop basiller</b>  <i>Eubacterium</i>, <i>Eggerthella</i>, <i>Bifidobacterium</i>, <i>Atopobium</i>, <i>Actinomyces</i>, <i>Propionibacterium</i>, <i>Clostridium</i> spp.</li> <li>• <b>Gram pozitif anaerop koklar</b>  <i>Coprococcus</i>, <i>Ruminococcus</i>, <i>Peptostreptococcus</i>, <i>Gemella</i>, <i>Finegoldia</i>, <i>Parvimona</i>, <i>Peptoniphilus</i>, <i>Anaerococcus</i></li> <li>• <b>Gram negatif anaerop koklar</b>  <i>Veillonella</i>, <i>Acidaminococcus</i>, <i>Megasphaera</i></li> </ul>

**Tablo 1.4.** Genito-üriner sistem florasındaki anaerop bakteriler.

<p>✓ <b>Vajen florası</b> <i>Pigmentli ve pigmentless Prevotella spp., Porphyromonas spp., Bacteroides spp. Anaerop koklar, Lactobacillus spp., Clostridium spp., Veillonella spp., Eubacterium spp, Propionibacterium spp.</i></p>
<p>✓ <b>Üretra (erkek ve kadın)</b> <i>Propionibacterium spp., Anaerop koklar, Bacteroides spp., Prevotella spp., Fusobacterium spp.</i></p>

## 2.5. Anaerop Bakteriyoloji Laboratuvarlarında Maliyet-Performans

### Değerlendirilmesi

Sınırlı kaynaklara rağmen anaerobik bakteriyolojiyi gerçekleştirmek gerçek bir ikilemdir. Anaerop enfeksiyonların genellikle polimikrobiyal olması, anaerop bakteriyolojinin yoğun ve zahmetli mikrobiyolojik çalışmalar gerektirmesi sebebiyle; anaerobik kültür çalışmaları külfetli işlemlerdir (Finegold ve ark. 1983; Nagy ve ark. 2018). Mevcut kaynaklarla hastalara en iyi hizmeti sunabilmek için, dikkat edeceğimiz birkaç hususla maliyetlerimizi azaltabiliriz.

- ✓ Uygun olmayan örneğin rededilmesi (Örneğin flora ile kontamine olması)
- ✓ Uygulanacak basit testlerle anaerop bakteri tanımlaması ( koloni morfoloji, Gram boyama, spot indol, katalaz, lipaz, lesithinaz, özel potenslerdeki antibiyotik disklerinin kullanımı)
- ✓ Selektif besiyeri kullanılarak bakteri türünün ön görülmesi ( *Bacteroides* safra eskülin agar; *B.fragilis* grup için selektiftir.18-24 saat içinde üreme gözlenir)
- ✓ Hastanın durumu, kliniği, örneğin türü ve üreyen anaerop bakterinin türüne göre kademeli identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık işlemleri ( *B.fragilis* grubu genellikle patojen iken; *B. merdae* kolon florası ile kontaminasyon ihtimalini düşündürür.)
- ✓ Basit testlerle cins ve tür düzeyinde anaerop bakterilerin tanımlanması

## 2.6. Anaerop Bakterilerin Patojenitesi Ve Virülans Faktörleri

Anaerop enfeksiyonların patogeneğinde, bakterilerin virülans faktörleri oldukça önem arz eder. Bunlar arasında toksinler (enterotoksinler, sitotoksinler, nörotoksinler), enzimler (lesitinaz, hemolizin, metalloproteazlar), metabolik ürünler (sülfür granülleri, süksinik asit ), antifagositik (kapsül), adezyon faktörleri ( adezin, fimbria, lektin) sayılabilir (Murray ve ark. 2016).

Anaerop enfeksiyonlar genellikle endojen kaynaklıdır. Doku bütünlüğünün bozulması, staz, hipoksi gibi koşullar ile hazırlayıcı faktörlerin bulunduğu durumlarda kolonize oldukları flora bölgesinden steril alana geçerek enfeksiyon oluştururlar. Anaerop enfeksiyonlarda anaerobik etkenlere fakültatif anaerop bakteriler eşlik eder, polimikrobiyal karakterdedir. Bu sebeple konağın immunitesi enfeksiyonun önlenmesinde oldukça önemlidir.

Anaerop bakterilerin patogeneğinde rol alan durumları aşağıdaki maddelerle özetleyebiliriz (Finegold 1995) :

- ✓ Anatomik bariyerde zedelenmeye yol açan; cerrahi, travma vb.
- ✓ Oksidasyon- redüksiyon potansiyelinde (Eh) azalma,
- ✓ Diğer bakterilerle sinerjistik etki, polimikrobiyal enfeksiyon,
- ✓ Bakteriyel inokulum miktarı,
- ✓ Humoral veya hücrel tip bağışıklıkta azalmayla seyreden, konağın savunma mekanizmalarındaki immun defekt durumları
- ✓ Bakteriye ait virülans özellikleri; adezyon, invazyon salgılanan enzim ve toksinler ile antifagositik özellik kazandıran yapılar (kapsül).

Anaerop enfeksiyona zemin oluşturan durumlar **Tablo 1.5.**' da özetlenmiştir (Finegold 1995; Gürler 2005)

**Tablo 1.5.** Anaerop enfeksiyona zemin hazırlayan durumlar.

Genel	Azalmış redoks potansiyeli (Eh)
Nötropeni	Doku anoksisi
İmmün süpresyon	Obstrüksiyon ve staz
Malignite	Doku yıkımı
Kollojen doku hastalıkları	Yabancı cisim
Diabetes mellitus	Yanıklar
Splenektomi	Kalsiyum tuzları
Hipogamaglobulinemi	Beraberinde aerop enfeksiyon varlığı
Sitotoksik ilaç kullanımı	Vasküler yetmezlik

Tablo 1.5.' da yer alan durumlar dışında anatomik bütünlüğü bozan her durum (hayvan ve insan ısırıkları), cerrahiler ile doku hipoksisi oluşturan durumlar (aspirasyon, bilinç kaybı, anaestezi) anaerop enfeksiyonlar için ortak etiyolojik faktörlerdir.

Gram negatif anaerop bakterilere ait temel virülans özellikleri **Tablo 1.6.**'da özetlenmiştir ( Tan ve ark. 1996; Güler 2005; Han 2015; Gholizadeh ve ark. 2017).

**Tablo 1.6.** Anaerop Gram negatif bakterilerin virulans faktörleri.

<i>Bacteroides fragilis</i>
Polisakkarit kapsül, fimbriyal adezinler, ısıya duyarlı çinko metalloproteaz ( <i>B.fragilis</i> toksin), heparinaz, nörominidaz, hemaglutinin
<i>Prevotella spp.</i>
Lipopolisakkarit kapsül, proteza
<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Fimbriya (TNF-alfa ve interlökin-betayı indükleme), proteazlar, kapsül, hemolizin
<i>Fusobacterium necrophorum</i>
Kapsül, proteaz, lökotoksin, endotoksin, adezinler, hemolizin, hemaglutinin, DNAaz
<i>F.nucleatum</i>
Kapsül, adezin ( FadA)

1960'lı yıllara kadar üzerinde en çok çalışılan anaerop bakteri cinsi *Clostridium* türleri olmuştur. Bu cins ana hatları ile; endospor varlığı, zorunlu anaerobik metabolizması, sülfatı sülfite indirgeme yeteneğinin olmaması ve Gram pozitif hüce duvar yapısı olmak üzere bu dört özellik üzerine tanımlanmıştır. Ancak zaman içinde cins içinde istisnaların olduğu görülmüştür. Örneğin bazı türlerinde sporlar seyrek oranda görülür ( *Clostridium ramosum*, *C.perfringens* ). Bazı türleri daima Gram negatif boyanırlar (*Clostridium ramosum*, *Clostridium clostriforme*); bazı türleri ise aerotolerandır (*Clostridium tertium*, *C.histolyticum*).

Son yıllarda gen dizileme yöntemlerinin kullanılması ile heterojen gruplar yeniden düzenlenmiş; klinik önemi olan türler 'homoloji grup 1'de toplanarak *Clostridium* cinsi içinde kalmaya devam etmiştir. Şimdiye kadar tanımlanan 200'ü aşkın türü olmasına karşın; klinik olarak önemi olan *Clostridium* türleri azdır (**Tablo 1.7.**) (Murray ve ark. 2016).

Anaerop bakterilerin virülans faktörlerinden en iyi tanımlanmış olanı ekzotoksinlerdir. *Clostridium botulinum*'un nörotoksinleri, toksin içeren gıdanın tüketimiyle alınabildiği için önemli bir halk sağlığı sorunudur (Scalfaro ve ark. 2019).

*Clostridium botulinum* toksini de tetanoz toksinine benzer yapıdadır; endopeptidaz aktivitesine sahiptir. Tetanoz toksininden farklı olarak bu toksin, toksik olmayan proteinlerle kompleks yapar halde bulunur. Bu sayede sindirim kanalından geçerken korunmuş olur. Botulinum toksini etkisini nöromusküler kavşakta gösterir. Botulinum toksini endopeptidaz aktivitesi ile asetilkolin salınımını düzenleyen proteinleri inaktive eder. Asetilkolin kas uyarımı için elzem olduğundan buradaki

tablo gevşek paralizidir. Botilismusta da klinik iyileşme; sinir uçlarının rejenerasyon süresine bağlı olarak sağlanır ( Murray ve ark. 2016; Scalfaro ve ark. 2019).

**Tablo 1.7.** İnsan Hastalıkları ile İlişkili *Clostridium* Türleri\*

Türler	Sebepl olduğu Hastalık	Sıklık
<i>C.difficile</i>	Pseudomembranöz kolit, Antibiyotik alımı sonrası diare	Yaygın
<i>C.perfringens</i>	Nekrotizan enterit, gıda zehirlenmesi, Septisemi, Yumuşak doku enfeksiyonları (miyozit, miyonekroz, gazlı gangren)	Yaygın
<i>C.botulinum</i>	Botulizm	Yaygın değil
<i>C.tetani</i>	Tetanoz	Yaygın değil
<i>C.septicum</i>	Gazlı gangren, septisemi	Yaygın değil
<i>C.clostriforme</i>	Fırsatçı enfeksiyonlar	Nadir
<i>C.butyricum</i>	Botulizm	Nadir
<i>C.histolyticum</i>	Gazlı gangren	Nadir
<i>C.baratii</i>	Botulizm	Nadir
<i>C.tertium</i>	Fırsatçı enfeksiyonlar	Yaygın değil
<i>C.amosum</i>	Fırsatçı enfeksiyonlar	Nadir
<i>C.novyi</i>	Gazlı gangren	Nadir
<i>C.innocuum</i>	Fırsatçı enfeksiyonlar	Nadir
<i>C.sordellii</i>	Gazlı gangren, septik şok sendromu	Nadir
<i>C.sporogenes</i>	Fırsatçı enfeksiyonlar	Nadir

\*Diğer *Clostridium* türleri insanda klinik oluşturur ancak öncelikli olarak fırsatçı patojenlerdir. *Clostridium clostriforme*, *C.amosum*, *C.innocuum* yaygın izole edilmelerine karşın nadiren hastalıklarla ilişkilidirler.

*Clostridium tetani* elverişsiz ortamda spor formuna dönüşerek canlılığını sürdürür. *C. tetani*'nin ürettiği iki toksin vardır: bunlardan ilk oksijene duyarlı hemolizin (tetanolizin), diğeri ise asıl tetanoz kliniğinden sorumlu plazmid tarafından kodlanan ısıya duyarlı nörotoksindir (tetanospazmin). Tetanospazmin genini taşıyan plazmid konjugasyon özelliği göstermemektedir. Bu sebepten ötürü toksik olmayan *C.tetani* suşları toksijenik şekle dönüşmemektedir. Tetanospazminin çinko endopeptidaz aktivitesine sahiptir. Bu toksin özgül olarak gama-aminobütirik asit (GABA) ve glisin gibi inhibitör nörotransmitterlerin salınmasında kontrol görevindeki proteinleri hedef alarak inaktive eder. Motor nöronlarda uyarıcı sinaptik aktivitenin düzenlenmesi bozulur, spastik felç görülür. Toksinin bağlanması geri dönüşümsüz; olduğundan iyileşme yeni aksonal uçların oluşmasına bağlıdır (Bartlett, 1992).

*C.perfringens*' in major toksini alfa toksin; trombositler, lökositler, eritrositler ve endotelial hücreleri parçalayan bir lesitinaz (fosfolipaz C)'dir. Bu toksin hemoliz,

vasküler geçirgenlikte artış, kanama, doku yıkımı (miyonekrozda olduğu gibi) ve miyokard fonksiyon bozukluğuna sebep olur. *C.perfringens* tarafından üretilen bir diğer toksin ise “süper antijen” özelliği olan enterotoksinidir. Bu toksin ince bağırsaktaki reseptörlerine bağlanarak, sulu diare tablosuna neden olur (Bryant ve ark, 2000).

*C.difficile*, toksin A (enterotoksin) ve toksin B (sitotoksin) olmak üzere iki temel toksini vardır. Bunlardan enterotoksin, nötrofiller için kemoatraktandır ve bu hücrelerin sitokin salınımlarına neden olur. Sitotoksini ise, intestinal duvarın geçirgenliğini arttırarak diare tablosuna sebep olur (Kıyan 1999; Birengel, 2001).

Anti fagositer özelliği olan ve hücre içi öldürmeyi inhibe eden süksinik asitler, anaerobik metabolizma sırasında ortaya çıkan kısa zincirli yağ asitleridir. *Prevotella* ve *Porphyromonas* türlerinin bazıları ürettikleri proteazlarla; immünglobulinleri parçalayarak antifagositer etki gösterirler (Murray ve ark 2016).

## **2.7. Anaerop Enfeksiyon Şüphesi Düşündürülen Durumlar**

Anaerobik bakteriyolojik çalışmalar için; örneğin anaerobik bakteri içerdiğine dair kuvvetle muhtemel ipuçları şunlardır (Finegold 1995; Gürler 2001; Jousimies-Somer ve ark. 2002):

- a. Örneğin kötü kokulu olması
- b. Mukozal yüzeyin proksimalinde yer alan enfeksiyon odakları
- c. İnsan veya hayvan ısırıklarına sekonder olarak gelişen enfeksiyonlar
- d. Örneğin gaz içermesi
- e. Önceki tedavilerinde anaerop etkinliği olmayan ya da anaeroplara zayıf etkili antimikrobiallerin kullanımı (aminoglikozidler, trimetoprim / sulfamethoksazol, 1. kuşak kinolonlar ve monobaktam )
- f. Kan içeren eksuda örneklerinde siyahlaşmanın gözlenmesi
- g. UV ışığı altında eksuda örneklerinin flöresans vermesi
- h. Patojene ait Gram boyamada tipik morfolojiklerinin görülmesi
  1. Mayide sülfür granüllerinin görülmesi (Aktinomikozis)
  - i. Sıvı besiyerlerinin dip kısımlarında üremenin gözlemlenmesi
  - j. Gram boyamada bakteri görülürken; aerobik koşullarda kültüre edilen besiyerlerinde üremenin olmaması
  - k. Lezyona ait yabancı cisim (taş, kurşun, taş vb.) varlığı
  - l. Abse oluşumu, krepatasyon varlığı

- m. Aerop şartlarda üreme gözlenmeyen numunenin; anaeroplara için olan selektif besiyerlerinde üreme gözlenmesi (Safra eskülin agar gibi.)
- n. Lezyonda pseudomembran olması
- o. Çeşitli malignitelere eşlik eden enfeksiyonlar
- ö. Septik tromboflebite eşlik eden enfeksiyonlar
- p. UV ışık altında Gram negatif basillere ait genç koloniler ( anaerobik şartlarda inkübe edildiyse) kırmızı floresans röfle verir.

## 2.8. Anaerop Bakterilerin Sebep Olduğu Enfeksiyonlar

Anaerop bakteriler vücudumuzun tüm dokularında enfeksiyona sebep olabilirler. Cerrahi, travma gibi doku bütünlüğünün bozulduğu şartlar ile fakültatif bakteriyel enfeksiyon varlığında hipoksi, redoks potansiyelinde azalma sebebiyle anaerop enfeksiyonlara zemin hazırlanmış olur. Anaerop bakteriyel enfeksiyonlar çoğunlukla polimikrobiyal karakterdedir.

Anaerop bakteriyel enfeksiyonlar kaynaklandığı durumlara göre iki gruba ayrılırlar (**Tablo 1.8.**);

1. Endojen kaynaklı anaerobik enfeksiyonlar (çoğunluğunu bu grup oluşturur)
2. Ekzojen kaynaklı anaerobik enfeksiyonlar

Gerek klinisyenlerin gerekse mikrobiyologların anaerobik enfeksiyonlara yaklaşım konusunda bilgi ve deneyimleri artsa da bugün için gelinen nokta da anaerop enfeksiyon etkenlerinin izolasyon oranları oldukça düşük kalmıştır. Bunda anaerop şüphesi olan örneklerin polimikrobiyal olması; anaerop bakterinin üreme hızının yavaş olup beraberindeki fakültatif anaerop bakterilerin daha hızlı üremeleri; anaerop bakterilerin sıklıkla gözden kaçmasına sebep olmaktadır. Anaerop bakteriler, tüm vücut bölgelerinde enfeksiyona sebep olabilirler. Ancak bazı durumlarda ve bazı vücut bölgelerinden (**Tablo 1.9.**) ve bazı enfeksiyon çeşitlerinden (**Tablo 2.**) izolasyon şansları oldukça yükselmektedir (Jousimies-Somer ve ark. 2002; Procop ve ark. 2017).

**Tablo 1.8.** Kaynağına Göre Anaerob Bakteri Kaynaklı Enfeksiyonlar (Procop ve ark. 2017).

EKZOJEN KAYNAKLI ANAEROP ENFEKSİYONLAR	ENDOJEN KAYNAKLI ANAEROP ENFEKSİYONLAR
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tetanoz</li> <li>• İnfant botulizm</li> <li>• Yara botulizm</li> <li>• Gıda kaynaklı botulizm</li> <li>• Selim seyirdeki yüzeysel yara</li> <li>• <i>Clostridium perfringes'</i> e bağlı gastroenterit</li> <li>• İnsan ya da hayvan ısırıklarını takiben görülen enfeksiyonlar</li> <li>• IV ilaç bağımlılarında enjeksiyona bağlı enfeksiyonlar</li> <li>• Gazlı gangren (miyonekrozis)</li> <li>• Septik abortus</li> <li>• Krepitan selülit (anaerobik)</li> <li>• Hastane bakımı ilişkili <i>Clostridium difficile</i> diarezi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Septik artrit</li> <li>• Kronik Sinüzit</li> <li>• Aspirasyon pnömonisi</li> <li>• Aktinomikozis</li> <li>• Bakteriyel vajinozis</li> <li>• Endokardit</li> <li>• Krepitan ve non-krepitan selülit</li> <li>• Dental ve periodental enfeksiyonlar</li> <li>• Osteomyelit</li> <li>• Peritonit</li> <li>• Kronik Otitis media</li> <li>• Subdural ampiyem</li> <li>• Beyin absesi ilişkili menenjit tablosu</li> <li>• Nekrotizan fasit</li> <li>• Bakteriyemi</li> <li>• Endoftalmitis (Cerrahi sonrası)</li> <li>• Torasik ampiyem</li> <li>• Apendisit ve kolesistit komplikasyonları</li> <li>• Lemierre sendromu</li> </ul>

**Tablo 1.9.** Çeşitli enfeksiyonlarda göreceli olarak anaerob enfeksiyon olma ihtimalleri (Jousimies-Somer ve ark. 2002; Procop ve ark. 2017).

ENFEKSİYON TİPİ	ANAEROP ENFEKSİYON SIKLIĞI (%)
Bakteriyemi	2,8 - 5,7
Oral cerrahi sonrası bakteriyemi	45 -70
Peritonsiller abse	82 – 87
Orofasyial / Dental orjinli abseler	67 – 100
Beyin abseleri	62 – 83
Aspirasyon pnömonisi	62 – 93
İntra-abdominal enfeksiyon (genel)	50 – 94
Apendisite sekonder gelişen peritonit	100
Pelvik abseler	88
İnsan ve hayvan ısırıkları	50 – 67
Diabetin ayak enfeksiyonları	40 – 95
Gazlı gangren (Clostridial myonekroz)	100

**Tablo 2.** Çeşitli enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilen bakteriler (Jousimies-Somer ve ark. 2002; Nagy ve ark. 2018).

Enfeksiyon tipi	Anaerop etken	Klinik bilgi
Oral / Dental enfeksiyonlar	<i>Prevotella</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Peptostreptokok</i> spp., <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Actinomyces</i> spp.	Çoğunluğu polimikrobiyal
Postanjinal septisemi ve Vincent anjini	<i>F.necrophorum</i> , <i>F. nucleatum</i>	
Beyin absesi	<i>Fusobacterium</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., <i>Propionibacterium acnes</i>	Çoğunlukla polimikrobiyal
Batın içi enfeksiyonlar	<i>B.fragilis</i> grup, diğer <i>Bacteroides</i> spp., <i>C. perfringens</i> , diğer <i>Clostridium</i> türleri <i>Actinomyces</i> spp.	Çoğunluğu polimikrobiyal
Endokardit	Spozuz Gram pozitif basiller, Gram pozitif koklar, <i>Bacteroides</i> spp.	Çok seyrek izole edilir.
Gazlı gangren	<i>C.perfringens</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C.novyi</i>	Sıklıkla Polimikrobiyal
Perianal/ Perirektal enfeksiyonlar	<i>B. fragilis</i> grup ve diğer <i>Bacteroides</i> türleri <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp.	
Kadın genito-üriner sistem enfeksiyonları	<i>Actinomyces</i> spp., Gram pozitif anaerobik koklar, <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp.	

## 2.9. Anaerop Kültür İçin Örnek Alımı, Seçimi ve Nakli

### 2.9.1. Örneğin Seçimi

Anaerobik bakteriyolojik çalışmaların en doğru şekilde yürütülebilmesi için örnek seçimi oldukça önemlidir. Uygun olmayan örneğin reddi ile; aşırı iş yükü ve maliyetleri azaltacaktır. Bilindiği gibi anaerobik flora gastrointestinal ve genito-üriner mukozal yüzeylerde bulunmaktadır. Bu bölgelerin örnekleri anaerobik kültür için uygun değildir. Yine aynı şekilde oral kavitede tükürükte ve gingival sekresyonlarda da anaerop bakteriler bulunmaktadır. En uygun örnekler apseler, doku örnekleri, steril vücut sıvıları ve biyopsi örnekleridir. Genel bir kural olarak eküvyonlu çubuk ile alınan sürüntü örnekleri anaerop kültür için uygun değildir.

Flora bakterileri ile yüksek olasılıkla kontaminasyonundan dolayı; anaerobik kültür çalışmaları için uygun olmayan ve alınması tavsiye edilmeyen örnekler aşağıda maddeler halinde verilmiştir (Gürler 2005; Jousimies-Somer ve ark. 2002; Procop ve ark. 2017).

1. Gingival veya diğer ağız içi yüzeysel sürüntü örnekleri
2. Boğaz veya nazofarengeal sürüntü örnekleri

3. Ekspektore edilerek alınan balgam örneği
4. Nazotrakeal ya da endotrakeal aspirat örnekleri
5. Bronşial sıvılar ve bronkoskop ile alınan diğer örnekler  
(İstisnai durum; Çift lümenli, korunmuş fırça ile alınan bronkoalveolar lavaj sıvılarından anaerop kültür çalışılabilir.
6. Mide ve ince bağırsak içeriği (“kör loop” ve benzeri sendromlar hariç)
7. Kalın bağırsak içerikleri (*C.difficile*, *C.botulinum*, *Anaerobiosprillum* türleri ve diğer spesifik etiyolojik ajanlar hariç)
8. İleostomi ve kolostomi sızıntıları
9. İdrar örneği (Suprapubik aspirasyon ile alınan idrar örneği hariç)
10. Vajinal ve servikal sürüntü örnekleri
11. Dekübitis ülserleri, diabetik ayak yaraları, perirektal abseler ve pilonidal sinüs kanallarından alınan yüzeysel sürüntü örnekleri

### 2.9.2. Örneğin Alınması

Örnek alımı sırasında, normal flora ile kontaminasyonun önlenmesi oldukça önemlidir. Flora ile minimal bir kontaminasyon bile yanlış sonuçlara ve emeğin kaybına yol açar. Genel olarak, eküvyonlu çubukla alınan kültür örnekleri anaerobik bakteriyolojik çalışmalar için uygun değildir. Eküvyonlu çubukla alınan materyalin az olması, flora ile kontamine olması sebebiyle tercih edilmemelidir (Jousimies-Somer ve ark. 2002).

Steril vücut bölgelerinden aspire edilen tüm materyaller anaerobik çalışmalar için uygundur. Örnek alımında cildin dekontaminasyonu şu şekilde yapılmalıdır: öncelikli olarak örnek alınacak yüzeyin merkezinden dışarı doğru sirküler hareketlerle %70’lik etil alkol ya da izopropil alkol ile yüzey kir ve yağlarından arındırılır; sonra %10’ luk povidon iyot (betadin) uygulaması yapılmalı 30 sn-1 dk ıslak olarak kalmasını bekledikten sonra alkol ile temizlenmelidir ( Jousimies-Somer ve ark. 2002).

Anaerop kültür için örnek alımında yapılması gereken işlemler infeksiyonun kaynaklandığı bölgeye göre değişmektedir (**Tablo 2.1.**).

**Tablo 2.1.** Anaerop Bakteriyolojik Çalışmalar İçin Örnek Alımı (Finegold 1995; Jousimies-Somer ve ark. 2002).

<b>İnfeksiyonun Yeri</b>	<b>Uygun olan örnekler ve örneğin alınma şekli</b>
<b>Akciğer ve plevra</b>	Çift lümenli korunmuş fırça ile alınan bronkopik materyaller, Perkütan akciğer biyopsisi ile alınan örnekler, Steril şartlarda alınan plevral mayi
<b>Abdominal bölge</b>	Steril şartlarda alınan parasentez sıvısı, Ameliyat sırasında veya USG eşliğinde derinden enjektörle alınan abse materyali,
<b>Kalın bağırsaklar</b>	Sadece <i>C. difficile</i> ve <i>C. botulinum</i> 'un etken olduğu durumlarda
<b>Üriner sistem</b>	Suprapubik aspirasyonla alınan idrar örneği
<b>Kemik ve Eklem</b>	Cerrahi sırasında alınan doku biyopsi örneği, derin doku biyopsisi ve aspiratı
<b>Kadın genital sistem</b>	Kuldosentez ile alınan peritoneal sıvı, cerrahi sırasında alınan doku biyopsi örnekleri, endometrial korunmuş fırça ile alınan örnekler
<b>Yumuşak doku ve açık yaralar</b>	Yüzey dekontaminasyonu sonrası, derinden alınan doku biyopsi örnekleri

### 2.9.3. Örneğin Nakli

Örnekler oksijenin zararlı etkilerinden ekimi yapılana kadar korunmalıdır. Uygun bir anaerop taşıma besiyeri ile anaerobik bakteri günlerce canlı kalabilir. Pürülan materyaller redükte edici perçok içeriği de muhtevasında bulundurduğundan anaerop bakterilerin canlılığı için pürülan olmayanlara göre daha koruyucudurlar. Cerrahi olarak alınan derin doku parçaları (>1cm<sup>3</sup>), steril taşıma besiyeri (ya da idrar kabı) laboratuvara ulaşana kadar 1-2 saatlik süre için konulabilir. İdrar ve gaita örnekleri anaerop bakterilerin yapısına zarar verecek enzimleri ihtiva ettiğinden dolayı; bu örnekler mümkün olduğunca acil kültüre edilmelidir. Örnekler oda sıcaklığında taşınmalı, asla buzdolabına konmamalıdır (Jousimies-Somer ve ark. 2002; Hentges 2012; Nagy ve ark. 2018).

Aspire edilen materyal enjektör ile nakledilmemelidir. Transport sırasında yaralanmalara ve biyolojik materyalin sızıntısı sebebiyle tehlike teşkil edebilir

(Mangels ve ark. 2004; Ozinel 2003). Aspirat anaerob transport besiyerlerine konulup gönderilmelidir (Hengtes 2012).

Ticari olarak bulunan swab transport besiyerleri mevcut (Amies, Cary- Blair taşıma besiyerleri) ile anaerob bakteriler en az 24 saat ve en fazla 48 saat olmak üzere canlılıklarını sürdürebiliyorlar.

## 2.10. Anaerobik Kültürde Kullanılan Besiyerleri ve Besiyeri Seçimi

Anaerob bakteriyolojik çalışmalarda tercih edilecek besiyeri çeşidi örneğin miktarına, bakteri cinsine ve laboratuvarın mali kaynaklarına bağlı olarak değişmektedir.

Genel olarak anaerob kültür çalışmaları için kullanılan besiyerleri şu üç grup altında toplanılabilir:

- Selektif olmayan genel üretim besiyerleri,
- Selektif agar besiyerleri,
- Zenginleştirilmiş besiyerleri

Selektif ve non selektif besiyerleri Tablo 2.2.'da gösterilmiştir.

**Tablo 2.2.** Anaerob kültür çalışmalarında kullanılan besiyerleri (Gürler 2005; Procop ve ark. 2017)

Seçici Besiyerleri	Seçici olmayan besiyerleri
Bacteroides bile esculin agar (BBE)	Scheidler kanlı agar
Anaerobe phenylethyl alcohol blood agar (PEA)	Brucella kanlı agar
Colistin-nalidixic acid kanlı agar	Colombia kanlı agar
Egg yolk agar (EYA) Fastidious anaerob	CDC anaerob blood agar
Phenylethyl alcohol agar (PEA)	Trypticase sodium agar (TSA)
Cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA)	Beyin kalp infusion agar (BHIA)
Mobilincus agar	Fastidious anaerob agar (FAA)
Kanamycin vancomycin kanlı agar (KVLB)	Tiyoglikolatlı buyyon
Anaerobe paromomisin vankomisin kanlı agar (PV)	Kıymalı glukozlu buyyon (Chopped meat glucose broth)

Anaerobik bakteriyoloji çalışmalarında kullanılacak besiyeri günlük olarak hazırlanmalı ve taze olarak kullanılmalıdır (Dowell 1974; Jousimies-Somer ve ark. 2002). Besiyerleri asla buzdolabına konularak bekletilmemelidir. Besiyerlerinin

zamanla okside olacağı ve performansının azalacağı akılda tutulmalıdır. Sıvı besiyeri kullanılmadan önce 5-10 dakika süre ile alevden geçirilirse redükte olması sağlanacaktır (Kıyan 1999; Jousimies-Somer ve ark. 2002; Procop ve ark. 2017).

### **2.10.1. Selektif Olmayan Genel Üretim Agar Besiyerleri**

Anaerop bakterilerin ilk izolasyonunda kullanılmak üzere, genellikle selektif olmayan besiyerleri tercih edilir. Bu besiyerlerine redükleyici maddeler olarak sistein, ascorbik asit, indirgeyici şekerler (glikoz), tiyoglikolik asit, sodyum sülfid ilave edilebilir. Besiyerini zenginleştirme için % 5 kan (at kanı, koyun kanı), vitamin K1 (1 µg/ml), hemin (5 µg/ml) ve maya özütü eklenebilir. (Kıyan 1999; Jousimies-Somer ve ark. 2002; Procop ve ark. 2017). Genellikle iki farklı genel üretim besiyerlerine ekim tavsiye edilmektedir.

### **2.10.2. Selektif Agar Besiyerleri**

Selektif olmayan baz besiyerlerine ilave selektif bir besiyerinin de kullanılması anaerop bakteri izolasyon şansını %94'e kadar çıkarmaktadır (Torun 2003).

#### **2.10.2.1. Bacteroides Safra Eskülin (BBE) Agar**

BBE agar, vitamin K1, hemin , %20' lik safra, gentamisin ve eskülin içerir. İçeriğindeki safra ve gentamisin çoğu aerop ve fakültatif anaerop bakterinin üremesini engeller.

*Bacteroides fragilis grubu* ve *Bilophila wadsworthia* için selektif besiyeridir. *B. vulgatus*, *B. stercoris* dışındaki *B. fragilis grubu* bakteriler eskülini hidrolize eder ve koloniler BBE agarda >1mm<sup>3</sup> çapında, sirküler, kabarıklık yapıda kahverengi-siyah haleli koloniler oluştururlar. Besiyerinin koyu renkli pigmentasyonunda, eskülinin hidrolizi sonucu oluşan maddelerin ve ferrik amonyum sitrat ile reaksiyona girmesidir. *Fusobacterium mortiferum* ve *F. varium*' da BBE besiyerinde üreyebilir. Ancak bu bakterilerin kolonisi düz ve düzensiz yapıdadır ( Jousimies-Somer ve ark. 2002; Isenberg 2004).

#### **2.10.2.2. Kanamisin-Vankomisin (KV) Hemolize Kanlı Agar**

*Prevotella* ve *Bacteroides* türlerinin seçici olarak üremelerini sağlar. *Fusobacterium* türleri de bu besiyerlerinde üreyebilirler. Bu besiyeri, koyun kanı, hemin, maya özü, vitamin K1 ve L-sistein ile zenginleştirilmiş bir besiyeridir. İçerdiği vankomisin ve kanamisinden dolayı pekçok fakültatif anaerop bakterinin

üremesi engellenir. *Porphyromonas* türleri besiyerinin içerdiği yüksek konsantrasyondaki vankomisin sebebiyle üremesi inhibe olur. *Porphyromonas* spp. izole edebilmek için besiyerinin vankomisin konsantrasyonunun (2 µg / ml) düşürülmesi gerekir (Jousimies-Somer ve ark. 2002).

#### **2.10.2.3. Yumurta Sarılı Agar (Egg Yolk Agar-EYA)**

Bu besiyerleri bazı anaerob bakterilerin sahip olduğu lesitinaz, lipaz ve protez aktivitelerine göre ayırt etmeyi sağlar. Koloni morfolojisi ve Gram boyama *Clostridium* spp. şüphesinde bu enzimatik reaksiyonlardan faydalanılmaktadır. *Clostridium perfringens* lesitinazları ile yumurta sarısındaki fosfolipidleri parçalar ve opak bir görünüm izlenir (Rosenblatt, 1997).

#### **2.10.2.4. Feniletıl Alkol Koyun Kanlı Agar (PEA)**

Gram pozitif ve Gram negatif zorunlu anaeroplara üremesini destekler. Fakültatif anaeroplara birçoğunun üremesini inhibe eder (Kıyan 1999; Winn 2006).

#### **2.10.2.5. Kolistin Nalidiksik Asit Kanlı Agar**

Selektif olarak Gram pozitif anaerobik bakterileri izole etmek için kullanılır (Kıyan 1999; Winn 2006).

#### **2.10.2.6. Sikloserin-Sefoksitin-Fruktoz Agar (CCFA)**

Fekal örneklerden ya da diğer intestinal materyallerden *C.difficile* izolasyonu için kullanılır. Bu besiyerinde *C.difficile* sarı koloniler oluşturur. Bu kolonileri uzun dalgalı (365 nm) bir UV lambası altında incelenebildiğinde; sarı floresans üretmesi *C.difficile* için tipiktir (Jousimies-Somer ve ark. 2002).

#### **2.10.3. Geri Dönüş Sıvısı**

Bu amaçla zenginleştirilmiş tiyoglikolat sıvı besiyeri ve etli glikozlu besiyerleri kullanılabilir. Tiyoglikolat sıvı besiyeri; serum, vitamin K1, hemin, protein, sodyum klorür, sodyum tioglikolat, glukoz, indirgen maddeler ve agar içerir. Yapısındaki indirgeci maddelerle redoks potansiyelinin düşük tutulmasını sağlar.

Gramda bakteri görülmesine rağmen kültürde üremenin olmadığı ya da plaktaki bakteri inokulumunun çok az olduğu durumlarda bu besiyerinden tekrar kültür için anaerobik bakterilerin muhafaza edilip, zenginleştirildiği geri-dönüş sıvı

besiyerleridir. Etli glikozlu besiyeri de aynı amaçla kullanılan özellikle *C.difficile*'nin izolasyonu için kullanılan sıvı besiyerleridir (Türkan 2008).

## **2.11. Anaerop İnkübasyon Sistemleri ve İnkübasyon Koşulları**

Anaerop bakterilerin izolasyon, identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık çalışmalarında anaerop ortam sağlayan çeşitli sistemler kullanılmaktadır. Bu sistemlere ait bilgiler aşağıda özetlenmiştir.

### **2.11.1. Anaerop Kabinler (Anaerobic chamber, Anaerobic glove box )**

Anaerop kabin içerisine içeriği %5 CO<sub>2</sub> ,%85 N<sub>2</sub>, %10 H<sub>2</sub> olan gaz karışımı verilerek ideal anaerop ortam oluşturulmaktadır. Bu kabinde anaerop bakteri identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık çalışmaları ideal anaerop ortamı sağlayan sistemlerdir. Kabin içi anaerop ortam devamlılığı indikatörlerle periyodik olarak takip edilmelidir (Jousimies-Somer ve ark. 2002; Nagy ve ark. 2018).

Dezavantajı; anaerop kültür örnek sayısının az olduğu laboratuvarlar için uygun bir sistem değildir (Jousimies-Somer ve ark. 2002).

### **2.11.2. Anaerop Jar Tekniği**

Anaerop jarlar (Almar, EM science, Oxoid, BBL, Mitsubishi, Key scientific); anaerop kültür ekimi, subkültürler için kullanılabilen sistemlerdir. Anaerop jarlarda oksijenin ortamdaki çıkarılarak anaerobik atmosfer oluşturulması esastır. Bunun için eskiden H<sub>2</sub> içeren bir gaz karışımı ve bu gaz karışımının oksijenle reaksiyonunu katalizleyen Palladium kaplı aliminyum granüller kullanılmıştır. Günümüzde tek kullanımlık H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> gaz karışımını ihtiva eden hazır ticari ürünler (Anaero-Gen, Oxoid) kullanıma sunulmuştur ( Hall ve Mangels 2016).

Anaxomat; üzerindeki valvler sayesinde otomatize olarak jar içi atmosferik havayı boşaltıp; jar içerisini %80 azot (N<sub>2</sub>), %10 karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve %10 hidrojen (H<sub>2</sub>) formülündeki gaz karışımını doldurarak anaerop ortamı sağlar.

### **2.11.3. Anaerop Plastik Poşetler**

Çeşitli firmalara ait ticari (Gaspak pouch, BBL; Anaerogen Compact, Oxoid; Anabag, Hady Diagnostics; Anaerocult P, Merk) olarak kullanıma sunulmuş plastik torba veya poşetler anaerobik sistemlere alternatiftir. Anaerobik jar mantığı ile anaerop ortam oluşturulur. Anaerop ortam bozulmadan üremenin olup olmadığının gözlemlenmesi diğer sistemlere üstünlüğüdür. (Mangels 2004).

#### **2.11.4. Roll Tüp Sistemi**

Bütün işlemlerin anaerop gaz akımı altında gerçekleşmesine olanak sağlayan PRAS (Pre-reduced Anaerobically Sterilized) sistemi ile bulunmaktadır. Ekipman gerektirmesi, zahmetli bir yöntem olması sebebiyle rutin çalışmalar için pek tercih edilmemektedir. Sistem oksijene çok hassas anaeroplara üretim ve laboratuvar çalışmaları için uygundur ( Hungate 1969).

Bütün anaerop sistemlerin indikatörler ile her kullanımda denetlenmesi gerekmektedir. Bu amaç için rezasurin içeren stripler (Difco, Oxoid) veya metilen mavisi stripleri (BBL) kullanılabilir. Anaerop ortamda strip renksiz olacaktır, eğer stripte renk değişikliği görülüyor ise anaerop ortamın sağlanmadığı düşünülmelidir (Jousimies-Somer ve ark. 2002).

#### **2.12. Örneklerin İşlenmesindeki Basamaklar**

##### **2.12.1. Materyalin Makroskopik İncelenmesi**

Materyalin rengi, kokusu, nekrotik parça, sülfür granülleri ve gaz içerip içermediği değerlendirilerek örneğin kalitesi hakkında bir ön fikir verebilir ( Jousimies-Somer ve ark. 2002; Hentges 2012 ).

##### **2.12.2. Örneklerin Ekim İçin Hazırlanması**

Makroskopik incelemeden sonra klinik örnek hazırlanarak anaerop ve aerop plak besiyerlerine ihtiyaç halinde ise; örneklerin sıvı besiyerine uygun şekilde ekimi yapılmalıdır. Eğer anaerop kabin bulunmuyorsa klinik numune 15 dakika içerisinde işlenmelidir. Karışık pürülan materyal vortekslenerek mikroorganizmaların dağılımı sağlanmalıdır. Doku ve kemik parçalarını ihtiva eden örneklerden 1 ml anaerobik sıvı besiyeri yardımıyla doku özütü elde edilmelidir. Hazırlanan örneklerden Pasteur pipeti ile; plak başına pürülan materyalden bir damla, pürülan olmayan materyallerden iki-üç damla olacak şekilde ekimi yapılmalıdır. Gram boyama için ise bir damla slayt üzerine yayılmalı; kalan numunenin zenginleştirme kültürü için sıvı besiyerine koyulması tavsiye edilmektedir (Jousimies-Somer ve ark. 2002).

##### **2.12.3. Örneğin Mikroskopik İncelenmesi (Gram Boyama)**

Gram boyama, anaerop bakteriyoloji için hızlı, pratik ve kullanışlı bir yöntemdir. Anaerop kültüre edilecek her örnekten Gram boyanma yapılmalıdır. Bu sayede örnekteki mikroorganizmaların ön tanımlaması yapılabilir ve bu inceleme ile

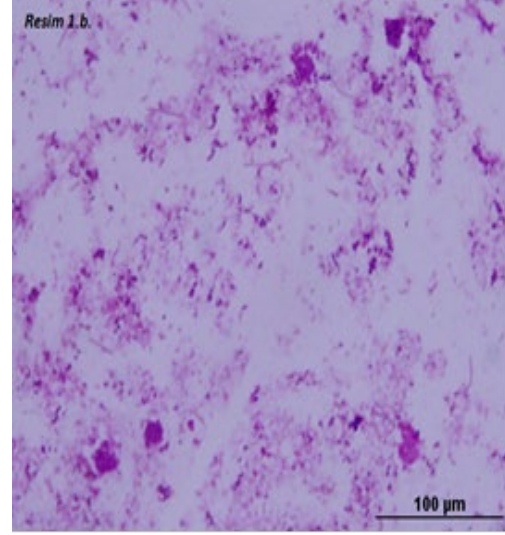
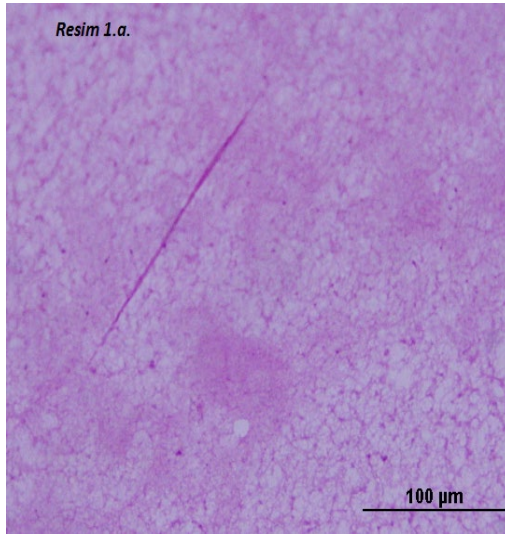
tercih edilecek besiyeri hakkında fikir edinilebilir (**Tablo 2.3.**) (Resim 1a ve Resim 1b). Gram boyamadaki fiksasyon aşamasında preparat, alevden geçirilmek yerine 30 saniye metanol ile fikse edilmelidir. Metanol ile fiksasyon yapılması bakteri hücre morfolojilerinin bozulmasını önleyecektir ( Jousimies ve ark. 2002).

**Tablo 2.3.** Anaerop bakterilerin Gram boyanma özelliklerine göre ön tanısı ( Jousimies-Somer ve ark. 2002; Levinson ve ark. 2018).

GRAM NEGATİF KOK	GRAM NEGATİF BASİL	GRAM POZİTİF KOK	GRAM POZİTİF SPORLU BASİL	GRAM POZİTİF SPORSUZ BASİL
<i>Veillonella</i> <i>Acidominococcus</i> <i>Megasphaera</i> <i>Negativococcus</i> <i>Anaeroglobus</i>	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Bilophila</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Parabacteroides</i> <i>Dialister</i>	<i>Peptoniphilus</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Atopobium</i> <i>Peptococcus</i> <i>Fingoldia</i> <i>Anaerococcus</i>	<i>Clostridium</i> <i>Filifactor</i>	<i>Actinomyces</i> <i>Propionobacterium</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Eubacterium</i> <i>Bulleida</i> <i>Eggerthella</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Mobilincus</i>

Gram boyamada bakteri morfolojisi tespit edilen örneklerin kültürlerinde üreme görülmemiş ise şu durumlar akla getirilmelidir (Forbes ve ark. 2007);

- ✓ Örneğin uygun olmayan transport yöntemiyle gönderilmesi
- ✓ Örneğin işleme alınış sırasında uzun süre oksijene maruz kalması
- ✓ Gerekli anaerop ortam şartlarında yetersizlik
- ✓ Eski besiyerinin kullanımı
- ✓ Hastanın antibiyotik kullanıyor olması



**Resim 1:** anaerop enfeksiyon düşünölen örneklereinden hazırlanmış Gram boyama görüntöleri (Çalışmamızdan).

**Resim 1.a.** Periton sıvı örneği, Gram negatif fuziform basil.

**Resim 1.b.** Derin doku örneği, Pleomorfik uzun Gram negatif basiller, Gram pozitif kok ve lökosit.

#### 2.12.4. Örneğin Ekimi ve İzolasyon Basamakları

Örneklere ilk ekimleri 35-37 °C de anaerop koşullarda minimum 48 saat inkübe olacak şekilde olmalıdır. *Actinomyces*, *Propionibacterium acnes* ve *Porphyromonas* türlerinin üremeleri için inkübasyon süresinin iki haftayı bulabileceği unutulmamalıdır. Besiyerleri ilk 48 saatte hiçbir şekilde açılmamalı ve oksijene maruz bırakılmamalıdır. İlk 48 saat bakterilerin en hızlı çoğaldığı logaritmik faz olduğundan; oksijene en hasas olduğu dönemdir (Jousimies ve ark. 2002; Procop ve ark. 2017).

Örneğin iki farklı türden genel anaerop besiyerlerine ekimi yapılmalıdır. Sıvı besiyerlerine 0.5-1.0 ml; katı besiyerlerine pürölan olmayan örnekten 2-3 damla, pürölan örnekten 1 damla şeklinde materyelin ekimi en kısa sürede gerçekleştirilmelidir. Ekimde kullanılacak besiyeri günlük ve taze olmalıdır (Jousimies ve ark. 2002).

48-72 saatlik inkübasyon sonrasında bir stereoskopik mikroskop ya da büyüteç yardımıyla üreyen koloniler incelenir. Besiyerinde üreyen ve anaerop şüphesi içeren koloniler iki ayrı besiyerine ekimi olacak şekilde pasajı yapılır. Plaklardan biri anaerobik sistemde diğeri CO<sub>2</sub>' li ortamda inkübe edilerek aerotolerans testi yapılır ( Jousimies ve ark. 2002; Procop ve ark. 2017; Nagy ve ark. 2018).

Klinik materyelin makroskopik ve mikroskopik inceleme ile örneğin kültür için ekiminin yapılmasına kadar olan süreç seviye 1 identifikasyon işlemleri olarak adlandırılır. Aerotolerans testleri ile anaerop bakteri olduğu saptanan koloniler seviye 2 tanımlama için identifikasyon işlemine alınır. Bu bakterilere ait kolonilerin saf kültürleri yapılarak daha ileri tanımlamaları (Seviye 3) yapılmak üzere işleme alınır. (Montero 1999; Forbes 2007).

#### **2.12.5. Kültürlerin Değerlendirilmesi**

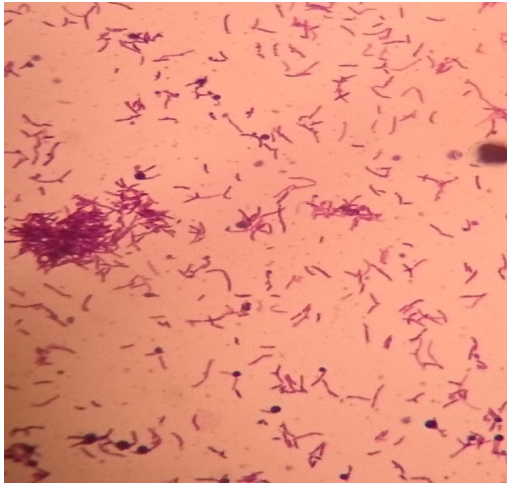
Kültürde üreme gözlenen plaklarda değerlendirmesi yapılırken koloni sayısına, baskın morfolojideki bakteri türüne dikkat edilmelidir. Kültürde üreme gözlenen farklı tipte kolon sayısı beş ya da daha fazla ise; ‘karışık flora olarak rapor edilmesi uyugu olacaktır. Ancak koloniler arasında *B.fragilis* grup gibi pek çok ilaca dirençli bir suş ürerse; tanımlama yapılması gerekebilir. Kolonilerden yapılan Gram boyamalar, değerlendirilerek ‘anaerobik Gram-pozitif kok’ gibi kısmi tanımlamaları yapılabilmektedir (Resim 2a. ve 2b.). Bazen Gram boyamada *Fusobacterium* ya da *Clostridium* türlerine spesifik bir görünüm saptanabilir. Bu durum ön raporda bildirilmelidir.

Klinisyen olası anaerop enfeksiyon düşündüğü durumu ciddi seyreden hastalarda laboratuvar ile iletişime geçmeli, mikrobiyolog ise son rapor öncesi elde ettiği ön tanıları klinisyen ile paylaşarak katkı sağlamalıdır (Jousimies-Somer ve ark. 2002).

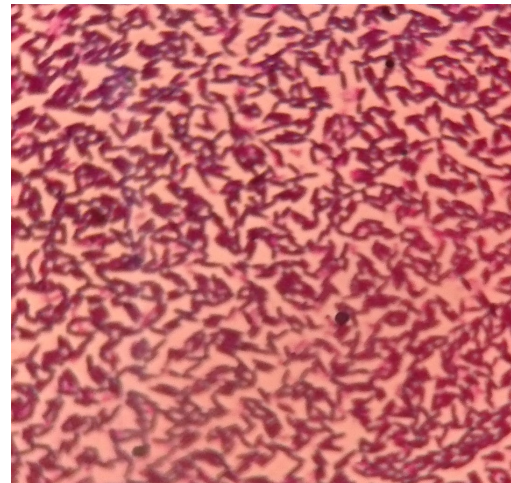
Kültürde anaerop bakteri üremesi saptanan plakları incelenirken kolonilerin morfolojisi, kolonilerin hemolizli, mat, parlak ve şeffaf olup olmaması, agarda çukurlaşma yapıp yapmaması, rengi, kokusu, pigment oluşturup oluşturmamaları, oluşmuş pigmentlerin renkleri, UV ışığı altında floresans verme özellikleri (**Tablo 2.4.**) değerlendirilmelidir (Nagy ve ark. 2018).

**Tablo 2.4.** Anaerop Bakterilerin Koloni Morfoloji Özelliklerine Göre Olası Etken (Kıyan, 1999; Gürlü, 2005; Procop, 2017)

KOLONİ ÖZELLİĞİ	OLASI ETKEN
<b>Renk/ pigment</b> Kahverengi-siyah koloni	Gram negatif basil: <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Prevotella</i> spp.
<b>Opak ya da benekli koloniler</b>	Gram negatif basil: <i>F.nucleatum</i> Gram pozitif kok: <i>Peptococcus niger</i>
<b>Pembe, kırmızı, sarı renk</b>	
<b>Yayılan koloni</b>	<i>C.septicum</i>
<b>Çift zonlu hemoliz</b>	<i>C.perfringens</i>
<b>Koku</b> Hoş olmayan tatlı kokusu At gübresi kokusu	Gram pozitif kok: <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> <i>Clostridium difficile</i>
<b>Agarı çukurlaştırma</b>	Gram negatif basil: <i>B.gracilis</i> , <i>B.ureolyticus</i>
<b>Sahanda yumurta görünümü</b>	Gram negatif basil: <i>F.varium</i> , <i>F.mortiferum</i>
<b>Ekmek kırıntısı görünümü</b>	Gram negatif basil: <i>F.nucleatum</i>
<b>UV ışığında floresans verme</b> <b>Kırmızı</b>	Gram negatif kok: <i>Veillonella</i> spp.
<b>Açık yeşil</b>	Gram negatif basil: <i>F.nucleatum</i> Gram pozitif basil: <i>C.difficile</i>
<b>Tuğla kırmızısı</b>	Gram negatif çomak: <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Prevotella</i> spp.
<b>Azı dişi görünüşlü koloni</b>	Gram pozitif basil: <i>A.israeli</i> (yaşlı koloni), <i>P.propionicum</i>
<b>Buzlu cam görüntüsü</b>	Gram negatif basil: <i>F.nucleatum</i>



**Resim 2.a.** Gram pozitif dallanan, basil yapısı (Çalışmamızdan)



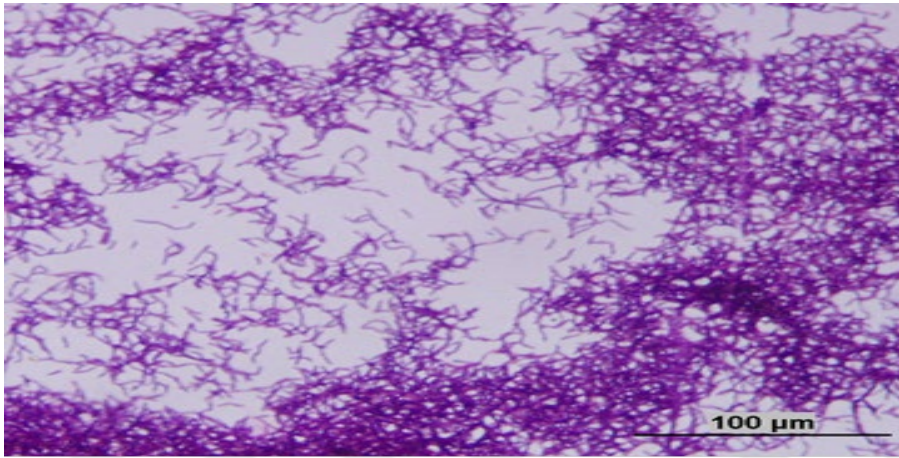
**Resim 2.b.** Gram pozitif basil morfolojisi

### 2.12.6. Anaerop Bakterilerin Tanımlanması

Anaerop enfeksiyonların polimikrobiyal olması, uzun inkübasyon süresi, konvansiyonel yöntemlerin zahmetli ve maliyetli olmaları sebebiyle her laboratuvar örnek sayısı ve mali durumuna göre değerlendirme yapmalıdır (Peeters ve ark. 2016).

#### 2.12.6.1. Seviye 1 Tanımlama

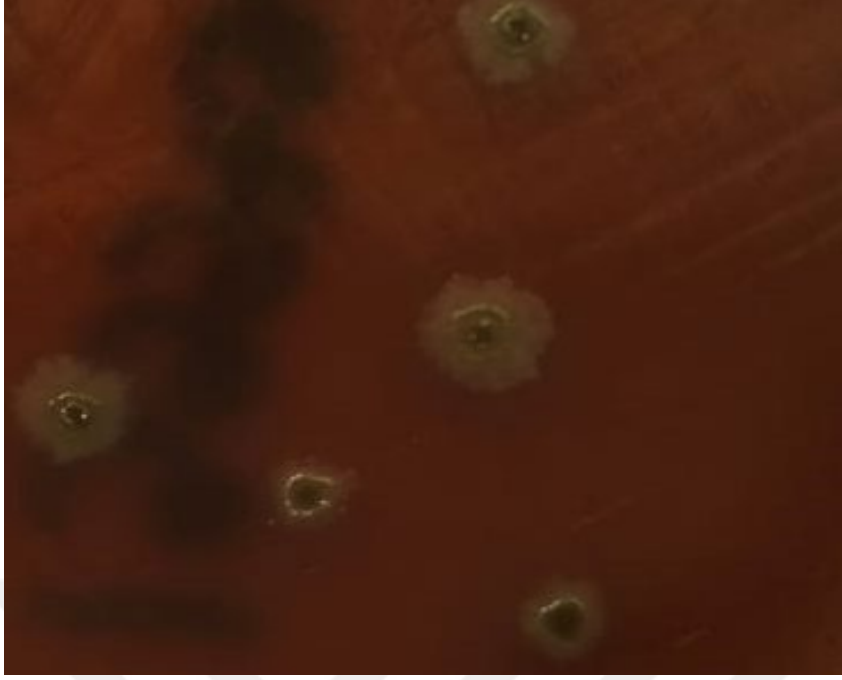
Bu identifikasyon seviyesinde kültürde üreyen anaeroplardan Gram boyanması, saf koloni eldesi için kültüre edilmesi ve besiyerlerindeki koloni morfolojilerinin yorumunu içermektedir (Resim2.c-f.).



**Resim 2.c.** Anaerop üreme gözlenen plaktan Gram boyama Gram pozitif dallanan basil ( Çalışmamızdan *Actinomyces odontolyticus*' a ait)



**Resim 2.d** Siyah -Kahverengi pigmente, küçük yuvarlak koloniler (Çalışmamızdan; *Prevotella* spp.'ye ait Scheadler agar koloni görüntüsü)



**Resim 2.e.** Koyu sarı renkli, düzensiz sınırlı, kabarık koloni yapısı  
(Çalışmamızdan; *Clostridium tertium* kolonisine ait görüntü)



**Resim 2.f.** *Bacteroides ovatus / thetaiotaomicron*  
(*Bacteroides fragilis* grup)

### 2.12.6.2. Seviye 2 Tanımlama

Seviye 1 testlerine ek olarak nitrat, indol reaksiyonu, katalaz, safraya olan direnç gibi basit testler yapılır. Bu testler dışında tanımlamaya yönelik olarak ek yapılabilecek biyokimyasal testler şu şekilde sıralanabilir:

- ✓ Katalaz
- ✓ Safrada üreme varlığı
- ✓ Eskülin hidrolizi
- ✓ Nitrat redüktaz aktivitesi (nitrat disk testi)
- ✓ SPS (sodyum polyanetolsulfonat) disk testi
- ✓ Karbonhidrat fermantasyon reaksiyonları
- ✓ Lesitinaz ve lipaz aktivitesi
- ✓ İndol reaksiyonu
- ✓ Toksin aktivitesi
- ✓ DNA-az araştırılması
- ✓ Jelatin hidrolizi

Biyokimyasal testlere ek olarak ön tanıya yardımcı olmak üzere özel potensleri antibiyotik diskleri kullanılabilir. Bu disklerle göre antibiyotik duyarlılık sonucu verilmez; sadece ön tanımlamaya yardımcı olur (Jousimies-Somer ve ark. 2002).

### 2.12.6.3. Seviye 3 Tanımlama

Son yıllarda yapılan çalışmalar anaerop enfeksiyonlarda etken olan anaerop bakterilerin ancak % 50-75'inin tanımlanabildiği gösterilmiştir. Anaerop bakterilerin geleneksel yöntemlerle tanımlanmasının zahmetli olması ve bu bakterilere ait taksonominin sıkça değişmesine karşın mevcut ticari sistemlerin veri tabanlarını sıkça güncellemeleri sebebiyle anaerop bakterilerin identifikasyonunda güçlükler yaşanmaktadır(Blairon ve ark. 2010; Lee ve ark. 2011; Nagy ve ark. 2018).

Anaerop bakterilerin identifikasyonunda kullanılmak üzere şimdiye kadar geliştirilen sistemleri şu şekilde sıralayabiliriz:

- ✓ Biyokimyasal sistemler ( BBL Crystal Anaerobe, Sceptor Anaerobe, API 20A)
- ✓ Hızlı (otomatize ya da manuel) enzim belirleme sistemleri;

- Rapid ID 32A (BioMérieux)
  - RapID ANAII (Remel, ThermoFisher)
  - ANI ANC Card-Vitek)
  - MicoScan Rapid Anaerobe panel (Beckman Coulter)
  - BBL Crystal Anaerobe Identification System (Becton Dickinson Microbiology Systems)
- ✓ Enzim substratı taşıyan diskler (ROSCO tablet)
  - ✓ İmmunolojik ve serolojik yöntemler: Özellikle *Clostridium difficile* toksinlerini saptamaya yönelik ELISA, toksin A, toksin B, toksin A-B
  - ✓ Matrix-aracılı lazer desorpsiyon-kütle spektrofotometrisi (MALDI-TOF MS)
  - ✓ Moleküler Yöntemler
- Real time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), 16S rRNA sekans gen analizi, DNA hibridizasyon, Ribotyping vb. (Kozlov 2018).

#### **2.12.7. Anaerop Bakteriler Antibiyotik Duyarlılık Testleri**

Anaerop bakterilerin direnç profillerinin zaman içinde değişmesi sebebiyle; anaerop bakterilerin duyarlılıklarını öngörmek giderek zorlaşmaktadır. Her geçen gün antibiyotik duyarlılık testlerine (ADT) olan gereksinimiz artmaktadır. Anaerop bakteriler için rutin laboratuvar ADT metodlarından ucuz, kolay, pratik olarak uygun bir yöntem henüz yoktur.

Anaerop ADT metodlarına ilişkin diğer bir zorluk oksijene olan hassasiyettir. Bazı zorunlu anaerop bakteriler oksijene çok hassas olduklarından üremeleri zarar görebilir. Metranidazolün aktivitesi sıkı anaerop koşullarına bağlıdır. Küçük miktarlardaki oksijen seviyesi bile metranidazolün aktif metabolitine dönüşmesini azaltır, bakterinin yanlış olarak dirençli olarak raporlanmasına sebep olur.

##### **2.12.7.1. Agar Dilüsyon Metodu**

CLSI'ın anaerop bakterileri için tavsiye ettiği referans antibiyotik duyarlılık test yöntemidir. Son olarak 2012 yılında CLSI tarafından revize edilerek; bu yönteme ait standartlar ortaya konmuştur. Buna göre CLSI M11-A8 (2012), hemolize koyun kanı (%5), vitamin K1 (1 µg/ml) ve hemin (5 µg/ml) ilavesiyle zenginleştirilmiş brucella agar kullanılarak yapılan agar dilüsyon yöntemini referans yöntem olarak belirlemiştir (Goldstein ve ark, 2011). Surveyans çalışmaları ve örnek sayısının fazla olduğu laboratuvarlar için elverişlidir (Nagy ve ark. 2018).

### 2.12.7.2. Sıvı Mikrodilüsyon Metodu

CLSI (M11-A8 2012), tarafından anaerop bakteriler için ‘brusella sıvı besiyeri ilave edilmiş standart sıvı mikrodilüsyon’ protokolü oluşturuldu. Ancak şuan için bu metodun sadece *B.fragilis grup* üyeleri için agar dilüsyona alternatif alabileceği bildirildi (Brook ve ark. 2013).

### 2.12.7.3. Gradyent Test Metodu

Referans yöntemle kıyaslandığında güvenilir sonuçlar veren, pahalı bir yöntemdir. Pratikte bu yüzden rutin laboratuvarlarda sıkça kullanılır. Anaerop AST için ticari olarak kullanıma sunulmuş gradient stripler bulunmaktadır. Gradyent strip antibiyotik duyarlılık testleri için önerilen besiyeri; % 5 koyun kanı, hemin, vitamin K1 takviyeli brusella agardır (Rennie ve ark. 2012; Brook ve ark. 2013; Nagy ve ark. 2018 ).

Anaerop bakterilerde en sık kullanılan AST metodlarına ilişkin avantajlar ve dezavantajlar **Tablo.2.5.**’ te verilmiştir.

Antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinde kullanılan kalite kontrol suşları aşağıdaki gibidir (Brook ve ark. 2013);

- *B. fragilis* ATCC 25285 ( Agar dilüsyon)
- *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 (Agar dilüsyon )
- *Clostridium difficile* ATCC 700057 (Agar dilüsyon)

**Tablo 2.5.** Anaerop Antibiyotik duyarlılık testi yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (Rennie ve ark. 2012; Brook ve ark. 2013).

<u>KULLANILAN METOD</u>	<u>AVANTAJLARI</u>	<u>DEZAVANTAJLARI</u>
<b>Agar dilüsyon</b>	Çok sayıda bakteri ve antibiyotik denenebilir. Referans yöntemdir.	Pahalı (az sayıda örnek için) bir yöntemdir Zahmetli
<b>Broth mikrodilüsyon</b>	Çok sayıda antimikrobiyal ve izolat denenebilir. Ekonomik, ticari paneller mevcut.	Bazı cinsler iyi üremez (Gram pozitif koklar) Sadece <i>B.fragilis</i> için valide
<b>E test</b>	Tek hasta suşları için uygundur. Heteroresistan suşları saptayabilme	Sürveyans çalışmaları için oldukça pahalı

## 2.13. Anaerobik Enfeksiyonlarda Tedaviler

### 2.13.1 Anaerobik Enfeksiyonlarda Tedavi Yönetimi Prensipleri

Anaerop bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlar yaygındır ve bu bakteriler ciddi ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlara sebep olabilirler. Anaerop bakterilerin yapıları gereği hassas mikroorganizmalar olması sebebiyle; enfeksiyon bölgesinden izolasyon oranları oldukça düşüktür. Anaerob bakterilerin yavaş üremeleri (laboratuvar tanımlamaları günler alır), enfeksiyonlarının polimikrobiyal olması, anaerobik bakterilerde artan antibiyotik direnci sebebiyle anaerobik enfeksiyonların tedavisi giderek zorlaşmaktadır ( Hentges 1993; Nagy 2010).

Anaerop enfeksiyonların tedavisinde şu üç ana tedavi prensibi hakimdir:

- Toksin nötralizasyonu
- Doku restirüksiyonu ile lokal bakteri çoğalmasını önlemek
- Enfeksiyonu sınırlamak, yayılımının önüne geçmek

Özellikle *Clostridium (tetani ve botulinum)* türlerinin sebep olduğu anaerop enfeksiyonların tedavisinde spesifik antitoksin tedavi oldukça önemlidir (Brook 2016a). Ancak *Clostridium perfringens'* in sebep olduğu gazlı gangren enfeksiyonlarında antitoksin tedavisi kullanımı hala tartışmalıdır. ( Hifumi ve ark. 2010; Hifumi ve ark. 2013).

Nekrotik doku debridmanı ve abse drenajı ile enfekte dokunun oksijenasyonu sağlanacaktır. Debridman ve yabancı cisim temizliği tedavi başarısı için oldukça önemlidir. Tedavi başarısını etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır: enfeksiyonun yaygınlığı ve ciddiyeti, yetersiz cerrahi debridman, hastanın yaşı, nütrisyonel durumu, komorbid hastalık, antibiyotiğin enfeksiyon bölgesine penetre olmasını engelleyen durum varlığı, antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu ya da doğru olmayan antibiyotik duyarlılık sonucu. uygunsuz tedavinin klinik cevap başarısını etkilediği; antibiyotik dirençli anaerop patojenler ile azalmış klinik yanıt arasında korelasyon olduğu pekçok retrospektif ve prospektif çalışmada bildirilmiştir (Brook 2007).

Anaerop bakteriler arasında artan antibiyotik direnci sebebiyle antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması gerekliliği giderek önem kazanmaktadır. Anaerop bakterilerin izolasyon ve identifikasyon çalışmalarında yaşanan güçlükler ve duyarlılık testlerinin zahmetli olması sebebiyle; in vitro duyarlılık deneylerinin her

zaman uygulanması gerekmemektedir. Ancak klavuzlarda belirtilen durumlarda uygulanması önemle tavsiye edilmektedir (Brook ve ark. 2013).

Anaerop bakteriler için duyarlılık testlerinin yapılması gerektiği durumlar maddeler halinde şunlardır (Citron ve ark. 2011; Wexler 2007; CLSI (Wayne, PA) 2012).

- *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Bilophila wadsworthia* ve *Sutterella wadsworthensis* gibi yüksek virülansa sahip bakteriler izole edildiğinde;
- Steril vücut bölgelerinden alınan kültürde anaerop patojen izole edildiğinde;
- Ciddi ya da yaşamı tehdit eden enfeksiyonların varlığında ( beyin apsesi, bakteriyemi ya da endokardit),
- Ampirik başlanan tedaviye yanıt alınamaması,
- Ampirik tedaviye klinik yanıt sonrası relaps görülmesi,
- Hastanın klinik seyrinde önemli olan bir antibiyotiğin kullanılması gerektiğinde;
- Enfeksiyonundan dolayı hastanın uzun süre antibiyotik tedavisi almak durumunda kalacağı durumlarda (septik artrit, protez enfeksiyonu, osteomyelit ),
- Yeni geliştirilen antimikrobiyallerin anaerop bakteriler üzerindeki etkinliğini saptayabilmek için,
- Yerel hastanelerde ampirik tedavi protokollerini oluşturabilecek surveyans verisini oluşturabilmek için antibiyotik duyarlılık testleri yapılmalıdır.

Rutin laboratuvar akışını da tüm anaeroplara antibiyotik duyarlılık testi çalışmak hem maliyetli hem de zaman alıcıdır. Ancak duyarlılık testleri, epidemiyolojik ve surveyans amacıyla sayılı ve belirli anaerop bakteri türleri için yapılabilir. Duyarlılık testleri, azami olarak şu antibiyotik gruplarını içermelidir; penisilin, betalaktam - betalaktamaz inhibitörü ile kombinasyon, klindamisin, metranidazol, karbapenem (ertapenem, meropenem ya da imipenem). İhtiyaç halinde ek olarak sefoksitin, tigesiklin ve mofsifloksasin duyarlılık testleri yapılabilir (Brook 2011).

Tüm anaerop bakterilere etkinliği olan antimikrobiyaller; betalaktam-betalaktamaz inhibitörlü kombinasyonu, kloramfenikol ve meropenemdir. Metranidazolun, en çok *Bacteroides* spp. ve diğer Gram negatif anaerop bakteriler üzerine etkinliği bulunmaktadır. Önemli Gram pozitif kok ve basiller (*Actinomyces*

spp., *Lactobacillus* spp. ve bazı *Propionibacterium* türleri) üzerindeki aktivitesi ise değişen ya da çok azdır. (Lofmark ve ark. 2010).

Penisilin ve ampisilin, birinci-,ikinci- ve üçüncü-kuşak sefalosporinler ve vankomisin gram pozitif bakterilerin çoğuna etkili olduğu bilinmektedir. Ancak bu antibiyotiklerin; gram negatif basillere etkisinin öngörülemediği ya da az olduğu düşünülmektedir (Rasmussen ve ark. 1997).

Penisilin G, pek çok Gram pozitif anaerob bakterinin in vitro duyarlı olduğu klasik ilaç seçeneğidir. *Peptostreptococcus* spp. ve çoğu *Clostridium* türü ( bazı *Clostridium ramosum*, *Clostridium clostridioforme* ve *Clostridium innocuum* hariç) penisiline duyarlıdır. Amoksisillin, ampisillin ve penisilin anaerob bakteriler üzerinde eşit etkinliğe sahip iken; semi-sentetik penisilinlerin etkinliği ana bileşenden azdır (Busch ve ark. 1976; Brook 2016b).

Oral ve intraabdominal anaerob bakterilerin beta-laktamaz üretimi sebebiyle; amoksisillin, ampisillin ve penisilin kullanımını sınırlıdır. Klavulanat, sulbaktam ve tazobaktam bakteriler tarafından üretilen beta-laktamaz enzimine geri dönüşümsüz olarak bağlanır. Betalaktam-betalaktamaz inhibitörlü kombinasyonlar miks enfeksiyonların (aerob-anaerob bakterilerin) tedavisinde iyi bir seçenektir (Brook 2016b; Nagy ve ark. 2018).

Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) kısa zaman önce *E.coli*'de artan direnç sebebiyle; *B.fragilis* ve diğer anaerob bakterilere karşı etkili olmasına karşın intra-abdominal enfeksiyonların tedavisinde ampisilin-sulbaktamı öneri listesinden çıkarmıştır (Solomkin ve ark. 2010). Amoksisillin-klavulanat, hala insan ve hayvan ısırıklarında (özellikle anaeroplara ilişkili) etkili bir seçenek olarak kullanılmaktadır. Piperasilin-tazobaktam ise; pek çok anaerob bakteri türüne karşı iyi aktivite göstermektedir (Solomkin ve ark. 2010; Brook 2016b). Pek çok anaerob bakteri sefalosporinaz taşıdığından; sınıf olarak sefalosporinlerin kullanımını sınırlıdır. *B.fragilis*' in sefoksitin duyarlılığı % 85 oranlarında iken; diğer *B.fragilis* grup üyelerinde duyarlılık daha düşüktür. Sefotetanın *B.fragilis* grup üyeleri üzerindeki etkinliği sefoksitine göre daha düşüktür. Seftriakson, sefoperazon ve sefotaksim Gram negatif anaeroplarda etkinliği güvenilir değildir. Seftazidim ve sefepimin ise hem Gram pozitif ve hem de Gram negatif anaeroplara karşı aktivitesi zayıftır. (Goldstein ve ark. 2009; Brook 2016b).

*Bacteroides fragilis*'in klindamisine direnci tüm dünyada artış göstermektedir. Klindamisin, intra-abdominal enfeksiyonların ampirik tedavisinde

artık önerilmemektedir (Hecht ve ark, 1993; Snyderman ve ark, 2011). Pediatrik intra-abdominal enfeksiyonu olan hastalara ait izolatların antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirildiği bir çalışmada; klindamisin direnci *B.fragilis*, *B. thetaiotaomicron* ve diğer *B.fragilis* grup bakterilerinde sırasıyla; % 6; % 80 ve % 45 olarak saptanmıştır (Goldstein ve ark, 2006). *Bacteroides* türleri dışındaki *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Probionibacterium acnes* gibi pek çok anaerob bakteride klindamisin direnci % 10'nu bulmaktadır. *Clostridium difficile*' de ise; klindamisin direnci çok daha yüksek oranlara ulaşmıştır (Aldridge ve ark. 2001).

Vankomisin ve daptomisin tüm Gram pozitif anaeroplara etkili iken; gram negatif anaerob basillere karşı etkisi bulunmamaktadır. Quinupristin-dalfopristin ise; *C. perfringens*, *Lactobacillus* spp., and *Peptostreptococcus* spp. türleri de dahil olmak üzere pek çok gram pozitif anaerob bakteriye karşı etkili bulunmuştur (Finch 1996; Blondeau ve Sanche 2002 ).

Makrolidler *B.fragilis* grubu ve *Fusobacterium* spp. haricindeki anaeroplara karşı orta ile iyi aktivite göstermektedir. Makrolidlerin etkili olduğu anaerob bakteriler arasında; pigmentli *Prevotella* türleri, *Porphyromonas* spp., Gram pozitif sporsuz anaerob basiller ile belirli *Clostridium* türleri yer alır (Brook 2016b).

Klindamisin anaerob bakteriler üzerine etkinliği olan geniş spektrumlu bir ajandır. Özellikle dental enfeksiyonlar ile aspirasyon pnömosinde kullanılır. Ancak kan-beyin bariyerini geçemediğinden menenjit tedavisinde endike değildir (Klainer ve ark 1987; Brook 2016b).

Tetrasiklinler ve eski florokinolonların anaerob bakteriler üzerinde etkinliği zayıftır. Ancak bazı geniş spektrumlu florokinolonlar (gatifloksasin ve mofsifloksasin) ve tigesiklin anaerob bakteriyel enfeksiyonlarda önemli bir tedavi seçeneği olma konusunda umut vaad etmektedir. Tigesiklininin etkin aktivite gösterdiği bakterilerin başlıcaları; *Streptococcus anginosus* grup (*S.anginosus*, *S.intermedius*, *S. constellatus*), *C. perfringens*, *C. difficile*, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides vulgatus* ve *Parvimonas micra*'dır. Tigesiklin *B.fragilis*' in neden olduğu komplike cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisi ile; *B. fragilis*, *B.thetaiotaomicron*, *B.uniformis*, *B. vulgatus*, *C.perfringens* ve *P.micra*'un etken oldukları intra-abdominal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almıştır (Babinchak ve ark, 2005; Brook 2016b).

Nitroimidazollerden; metronidazol ve tinidazol anaerop bakteriler üzerinde benzer etkinliğe sahiptir. *B.fragilis grup* ve diğer *Bacteroides* türlerine, *Fusobacterium* spp. ve *Clostridium* spp. üzerine oldukça etkilidir (Keating ve ark, 2005) Anaerop bakterilerin sebep olduğu santral sinir sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde de metronidazolun etkili olduğu bildirilmektedir (Brook, 1983).

Gram pozitif anaerop koklarda metranidazol direnci nadirdir. Metronidazol dirençli anaerobik kok izole edildiğinde metronidazole her zaman dirençli olarak bilinen *Streptococcus anginosus* ile karışabileceği akla gelmeli ve identifikasyonu doğru olup olmadığı kontrol edilmelidir. Gram pozitif anaerop basillerde yaygındır. Mikroaerofilik streptokoklar, *Propionibacterium acnes* ve *Actinomyces* spp. ise metronidazole dirençlidir (Brook 2011).

Karbapenemler ise; Gram negatif (*Bacteroides* spp. ve *Prevotella* spp. dahil) ve Gram pozitif anaerop bakterilerin çoğuna karşı mükemmel etkinlik göstermektedir (Brook 2016b).

Seftolozan-tazobaktam; yeni bir oksimino-sefalosporin olan seftolozan ile beta-laktamaz inhibitörlerinden tazobaktamın birleşimi ile etkinliği artırılmıştır. 2014 yılında komplike intraabdominal enfeksiyonlarının metranidazole kombine kullanımı endikasyonu ile FDA tarafından onay almıştır (Akyüz ve ark. 2020). Anaerop bakteri türleri etkinliğinin değişkenlik gösterdiği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Gram pozitif anaeroplarda düşük MİK değerleri saptanırken; *B. fragilis* dışı *B. fragilis grup* üyelerinde MİK değerleri değişkenlik göstermiştir (Snydman ve ark. 2014; Armstrong ve ark. 2016).

## **2.13.2. Anaerop Bakterilerde Antibiyotik Direnci**

### **2.13.2.1. Beta-Laktam Antibiyotik Direnci**

Betalaktam antibiyotikler, hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisidal etkisi olan antibiyotik grubudur. Beta-laktam antibiyotiklere direnç temel olarak şu üç mekanizma ile gerçekleşmektedir:

- Beta-laktamaz üretimi (penisilinaz, sefalosporinaz),
- Dış membran proteinlerinde değişikliğe bağlı olarak, membran geçirgenliğinde azalma,

- Penisilin bağlayan proteinlerde değişikliğin oluşması (PBP2 Bfr, *Bacteroides fragilis* grup bakterilerinde Beta-laktam antibiyotiklerin bağlandıkları proteinlerdir.) (Torun M 1999; Piriz ve ark. 2004; Pence 2019).

Özellikle *B. fragilis* grup and *Prevotella* spp. türlerinde belirgin olmak üzere anaerop bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere direnç; beta-laktamaz üretimi yoluyla olmaktadır ( Kuriyama ve ark. 2000). Beta-laktamazlar; penisilin ve sefalosporinin yapısındaki siklik amid yapısını parçalayarak antibiyotiği inaktive ederler. Beta-laktamazlar, indüklenebilir veya yapısal olabilir, genetik olarak aktarılabılır; kromozomal ya da plazmid kökenli olabilirler (Bush 1999). *B. fragilis* grup üyelerinin çoğu yapısal beta-laktamazlardan sefalosiporinaz üretirler.

Pigmentli *Prevotella* spp. ile *Porphyromonas* spp., *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens* ve *Fusobacterium nucleatum* öncelikli olarak penisilinaz üretirler. Penisiline dirençli ilk vaka 1966 yılında, sefoksitine dirençli vaka ise ilk kez 1983'te bildirilmiştir (Nord ve ark. 1990; Mamal 1999). Gram pozitif anaerop koklar ise geneli penisiline duyarlıdır. Henüz bu bakterilerin beta-laktamaz üretimi bildirilmemiştir ( Hetch 2006; Akgül 2018).

Karbapenemazlar, karbapenemler de dahil olmak üzere tüm beta-laktam antibiyotikleri inaktive edebilen beta-laktamazlardır. Bu enzimlerin geneli kromozomal geçişlidir. Ancak *B. fragilis* izolatlarında, plazmid aracılığıyla geçebilen bir metallo-beta-laktamazın varlığı Japonya'dan bildirilmiştir (Bandoh ve ark. 1992). Metallo- beta-laktamaz yapısındaki bu enzimler klasik beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler ve sadece EDTA ile inhibe olurlar.

*Bacteroides fragilis*' te karbapenem direncinden sorumlu gen, cfiA ( *ccrA* olarak da bilinir) olup; kromozomda yer alırlar. cfiA direnç geni, 'sessiz' olabileceği gibi değişik seviyelerde metallo-beta-laktamaz ifade edebilir. Sessiz durumdaki cfiA direnç genlerinin aktifleyicisi Insertion Sequences (IS) elementi adı verilen mobil DNA parçalarıdır. IS elementlerinin sessiz konumdaki cfiA gen bölgesinin ön kısmına eklenmesi ile; direnç geni uyarılarak enzim sentezini başlatabilmektedir. Sessiz konumdaki cfiA genini uyarıcı IS elementleri arasında IS1187, IS4351, IS942, IS1169, IS1186 sayılabilir (Podglajen ve ark. 1994; Kato ve ark. 2003; Ho ve ark. 2017). Önemli cfiA genlerinin varlığı karbapenem direncine sebep olmaz. Bu genler normalde konstitüsyonel ve düşük seviyelerde eksprese edilip ancak IS elementleri

gibi bir promotor sekans aktivatörü bu ekspresyonu artırır. Nitekim Avrupa’da *B.fragilis* suşlarının % 9.4’ ünün cfiA genini taşıdığı ancak sadece % 0.8 ‘inin imipenem direnci olduğu saptanmıştır (Eitel ve ark. 2013)

Karbapenem dirençli ilk vaka 1983 yılında bildirilmiş olup, günümüzde direnç %1 -4 oranında değişmektedir. Taiwan’ da yapılan bir çalışmada *B. fragilis* ve *B. fragilis* grup ile bazı *Prevotella* türlerinde artan karbapenem direnci dikkat çekicidir (Cooley ve ark. 2019).

Anaerob bakterilerde karbapenem direnci düşük düzeydedir. Ertapenem direnç, meropenem ya da imipenem göre daha yüksek oranlarda saptanmaktadır. Slovenya, İspanya, Avustralya, Brezilya ve Kore’ den bildirilen yayınlarda karbapenem direnci düşük ( < % 2) seviyelerde tespit edilmiştir. Karbapenem direnci Asya ülkelerinde arttığı tespit edilmiştir. Japonya’dan orta düzeyde imipenem direnci ( % 3-10) rapor edilirken; Pakistan (% 24,1) ve Moğolistan’ da karbapenem direnci oldukça yüksek seviyelere ( *B. fragilis*’ te % 38.5 ) ulaşmıştır (Cooley ve ark. 2019).

Daha da önemlisi Avrupa’da karbapenem direncinin düşük oranlarda saptanmasına karşın, imipenem için azalmış duyarlılık (minimum inhibitör konsantrasyonlardaki artış) dikkat çekicidir. Bu azalmış duyarlılığın klinik etkisi net olmamakla birlikte, kaygı vericidir (Nagy ve ark. 2011).

### 2.13.2.2. Metranidazol Direnci

Metronidazol, 1970’ li yıllarda bulunan 5-nitroimidazol türevidir, bakterisidal etkili bir ajandır. Metronidazol direncinin çoğunluklu olarak; nim (A-K) olarak adlandırılan direnç genleri tarafından kodlanan 'nitroimidazol redüktaz' enzimine bağlı olduğu gösterilmiştir ( Pence 2019). ‘nim genleri’ kromozomal ya da plazmid yerleşimli bulunabilirler. Pek çok anaerob bakteri bu direnç genlerini içermesine rağmen; *Bacteroides spp.* ve *Parabacteroides spp.* türlerinde baskın olarak bulunurlar. nim genlerinin bakteri de bulunması fenotipik dirence yansımayabilir. Nim gen ürünleri düşük seviyede ekspresyon alır. Ancak ilişkili IS elementinin (IS942, IS1168, IS1186, IS4351, IS1169) eklenmesi ile aktive olur ve ekspresyonu artırır. Günümüzde metranidazol direnci Avrupa ve Amerika’da % 2’nin altında iken,

Pakistan’da direnç (*B.fragilis* ) % 20.6’ ya kadar çıkabilmektedir (Cooley ve ark. 2019).

### **2.13.2.3. Klindamisin Direnci**

Tüm anaerop bakteriler arasında geçen yıllara oranla klindamisin direncinin artış gösterdiği pek çok çalışmada rapor edilmiştir. Klindamisin direncinden büyük oranda erm geni tarafından kodlanan 23S RNA metilaz sorumlu tutulmuştur (Pence 2019). Özellikle *B.fragilis* grup bakterileri arasında saptanan yüksek oranlardaki klindamisin direnci sebebiyle; intra-abdominal enfeksiyonların ampirik tedavisinde klindamisinin kullanımı önerilmemektedir. TEST çalışma grubunun yürüttüğü bir araştırmada klindamisin direnç oranları Gram negatif anaeroplara için % 28,4 - 48,1; Gram pozitifler için % 10,9 - 22,1 olarak tespit edilmiştir (Brook ve ark. 2013).

### **2.13.2.4. Florokinolon Direnci**

Kinolon grubu ilaçlardan anaerop bakteriler üzerinde etkinliği olan; trovafloksasin, gatifloksasin ve moksifloksasindir. Bu ilaçlardan mofsifloksasin *B.fragilis*’ in sebep olduğu komplike cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisi ile; *B.fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *Peptostreptococcus* spp., ve *C.perfringens*’in sebep olduğu mikts intra-abdominal enfeksiyonların tedavisinde FDA onayı almıştır. Ancak hem *E.coli*’ de hem de *B.fragilis*’ te artan kinolon direnci; mofsifloksasinin intra-abdominal enfeksiyonlarda kullanımını açısından klinisyenleri düşündürmektedir. Pek çok çalışmada *B.fragilis* suşlarında artan mofsifloksasin direnci bildirilmiştir (Sherwood ve ark. 2011; Cobo ve ark. 2019).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinden anaerop bakteriyel enfeksiyonu düşünülen ve 1 Ağustos 2019 ile 25 Mart 2020 tarihleri arasında Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na kabul edilen örneklerden (periton sıvısı, plevra sıvısı, drenaj mayi, abse materyali, , derin doku biyopsisi, kan, BOS, eklem sıvısı vb.) 197 'ü çalışmaya alındı. Çalışma izni Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulu' ndan 17 Şubat 2017 Tarih İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Etik kurulu; 2017/804 sayılı kararı ile alınmıştır.

Çalışmaya başlamadan önce kliniklerle iletişime geçilerek anaerop bakteriyel enfeksiyonların özellikleri, örneğin alınması ve transportu ile ilgili olarak bilgilendirildi. Örneğin transpotu için hazır ticari tiyoglikonatlı sıvı besiyerleri; anaerop enfeksiyon sıklığının fazla olduğu cerrahi servislere ulaştırıldı. Anaerop enfeksiyon şüphesinde; sıvı bazlı numuneler ve kan örnekleri için hem transport hem de kültür ortamını sağlayan otomatize kan kültür cihazımızla uyumlu "BD BACTEC™ Lytic Anaerobic medium" kan kültür şişeleri klinisyenle görüşülerek ilgili servislere sağlandı. En az 3-10 ml sıvı materyal şişelere inoküle edilerek ulaştırıldı. Örnek alımında cilt ve mukoza dekontaminasyonuna dikkat edilmesi hususunda klinisyen bilgilendirildi.

Örnekler laboratuvara ulaşır ulaşmaz değerlendirmeye alındı. Hasta bilgileri eksik olan numuneler çalışma dışı bırakıldı. Steril enjektörde ve steril plastik kaplarda gelen örnekler anaerop enfeksiyon için uygun örnek olup olmadığı değerlendirildi. Uygun şartlarda alınmayan ve taşınmayan örnekler ile pamuklu eküvyonla alınan yüzeysel sürüntü örnekleri çalışma dışı bırakıldı.

Çalışmaya aldığımız örnekleri makroskopik özellikleri (materyalin nekrotik doku içermesi, kötü koku, pürülan, kanlı) öncelikli olarak değerlendirildi ve Gram boyamaları yapıldı. Gram boyamasında; spor içerip içermemesi, anaerop bakteriler için tipik morfolojik görünümü, pleomorfik boyanma gibi morfolojik özellikleri dikkate alınarak primer kültür ekimi yapıldı.

#### 3.1. Kültür

Anaerop enfeksiyonların polimikrobiyal seyirli olması sebebiyle örnekler eş zamanlı olarak aerobik bakteriyolojik etken yönünden de değerlendirilmeye tabi tutuldu. Bunun için örneklerin % 5 insan kanlı agar ve Eozilen metile blue (EMB)

agara ekimi yapıldı. Aerop koşullarda 35-37 °C'de 24 saat inkübe edilmek üzere etüvlere yerleştirildi.

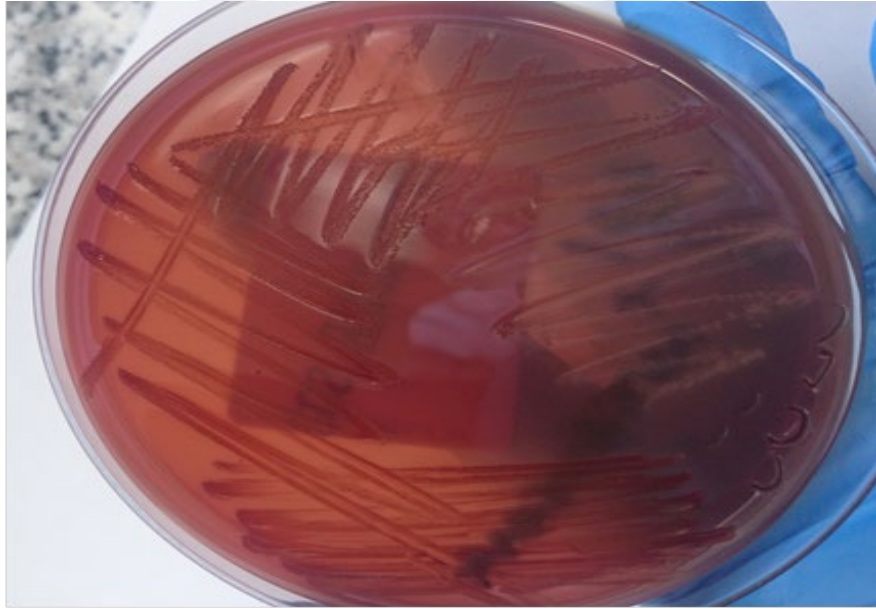
Uygun örnekler anaerobik kültür için, %5 koyun kanı ve vitamin K1 ile zenginleştirilmiş Scheadler temel anaerop besiyerine ekimi yapıldı. Scheadler besiyeri günlük hazırlandı ve taze olarak kullanıldı. Sıvı besiyerlerinden ise; tiyoglikonatlı broth kullanıldı. Tiyoglikonatlı sıvı besiyeri kullanılmadan önce ısıya tabi tutularak, redükte olması sağlandı. Örneğin sıvı besiyerinin dip kısmına ekimi sağladı. Aynı zamanda örneklerden iki preperat hazırlandı ve metanolle fikse edildi. Mikroskopik özellikler kaydedildi. Tiyoglikonatlı sıvı besiyerleri Gram boyamada bakteri görüp; kültürde üretmediğimiz ya da çok az bakteri kolonisi saptadığımız örneklerde yeniden ekim için kullanıldı. Selektif besiyeri olarak Bacteroides Safra Eskülin agar kullanıldı.

Ekimleri yapılan plaklar anaerop jara (Oxoid, İngiltere) yerleştirildi. Bölüm 2.1.1.de anlatılanlara uygun olarak anaerop ortam oluşturuldu. 35-37 °C 'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Anaerop ortamın denetlenmesi için indikatör olarak resazurin içeren strip testler (Oxoid, Hampshire, İngiltere) kullanıldı. Stribin mavi renkten beyaza dönmesi ile anaerop ortamın sağlandığı düşünülürken (Resim 3.0.); renk değişikliği gerçekleşmediyse anaerop ortamın oluşmadığı düşünüldü ve jar açılarak yeniden anaerop şartlar sağlanmaya özen gösterildi.

48 saatlik inkübasyon sonrasında aerop ortamda üreme gözlenmeyen ancak anaerop ortamda üreyen koloniler incelendi. Scheadler besiyerinde üreyen ve anaerop bakteri olması beklenen koloniler iki ayrı besiyerine ekimi olacak şekilde pasajı yapıldı. Plaklardan biri anaerobik sistemde diğeri CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edilerek aerotolerans testi yapıldı. Her iki ortamda da üreme gösterenler fakültatif anaerop bakteri; sadece anaerop ortamda üreyenler ise anaerop bakteri olarak ileri tanımlama ve antibiyotik duyarlılık çalışmasına alındı.



**Resim 3.0:** Genbag (Biomeriux, Fransa) içi anaerop ortamın rezasurin (Oxoid, UK) adı verilen indikatör strip ile denetimin yapılması; strip testteki maviden beyaz renge olan değişim anaerop ortam şartların sağlandığına işaret etmektedir (Çalışmamızdan).



**Resim 3.1.** Ana plaktan E-test ve identifikasyon diskleri ile tanımlama için saflaştırma pasajı yapılmış *Actinomyces meyeri / odontolyticus* 'ye ait görüntü (10 günlük inkübasyonu sonrası alınan fotoğraf- tuğla kırmızısı koloniler

### 3.2. İzole Edilen Anaerob Bakterilerin Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi ve Tanımlanması İçin Yapılan İşlemler

Kültürlerden izole edilen anaerob bakterilerin tanımlanmasında API 20A (biomeriux, Fransa) panelleri, VITEK 2 yarı otomatize sistemle uyumlu Vitek ANC (biomeriux, Fransa) identifikasyon kartları ve geleneksel yöntemler kullanıldı. Anaerob bakterilerin tanımlanmasında başvurduğumuz konvansiyonel yöntemler;, kolonilerin ve bakterilerin boyalı preparatta morfolojik görünümünün değerlendirilmesi, bakterinin çeşitli biyokimyasallara etkisi, %20'lik safıralı besiyerinde üreme ve eskülin hidrolizi (**Resim 3.3.**) AnIDENT (Oxoid, UK) antibiyotik tanı diski ile duyarlılık zonlarının değerlendirilmesidir.

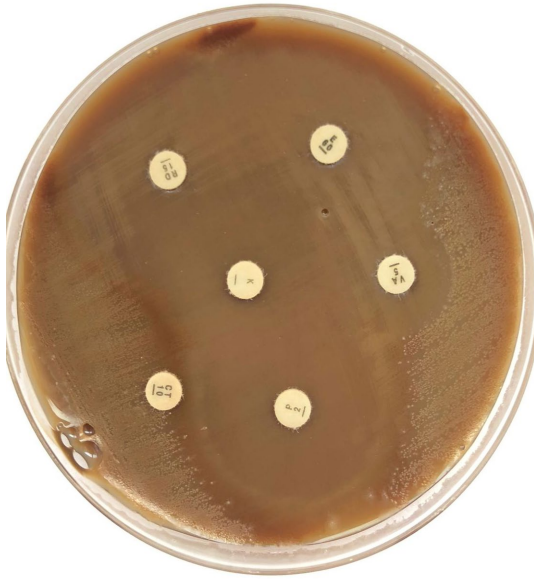
Çalışmamızda rutin laboratuvar akışında sıkça kullanılan API 20A panelleri ve Vitek ANC kartlarının anaerob bakteri tanımlamasındaki performanslarını karşılaştırılması amaçlanarak her iki sistemde tanımlanan anaerob bakterilerin cins ve tür düzeyindeki kategorik uyumunun gösterilmesinde sayı ve yüzdelikler kullanılmıştır.

Antibiyotik tanı diskleri testi için; eritomisin (60 µg), kolistin (10 µg), kanamisin (1000 µg), rifampisin (15 µg), penisilin (2 units) ve vankomisin (5 µg) diskleri için ticari panel halinde hazırlanmış An-Idend Discs (Oxoid, Hampshire, İngiltere) kullanıldı. Antibiyotik diskleri ile ön identifikasyon için, buyyon içerisinde hazırlanan bakteri süspansiyonu steril pamuk eküvyon çubuklar yardımıyla tüm yüzeyi kaplayacak şekilde Scheadler besiyeri yüzeyine sürülerek ekimleri yapıldı ve antibiyotik diskleri besiyeri yüzeyine yerleştirildi. 48 saatlik anaerob ortamda inkübasyondan sonra zon çapları ölçülerek değerlendirildi. 10 mm'den küçük olanlar ise dirençli (R); zon çapı 10 mm'den büyük olan diskler duyarlı (S), olarak değerlendirildi. Tanımlama firma önerisi doğrultusunda; aşağıda verilen **Tablo 3.0'a** göre yapılmıştır (**Resim 3.2** ve **Resim 3.4.**).

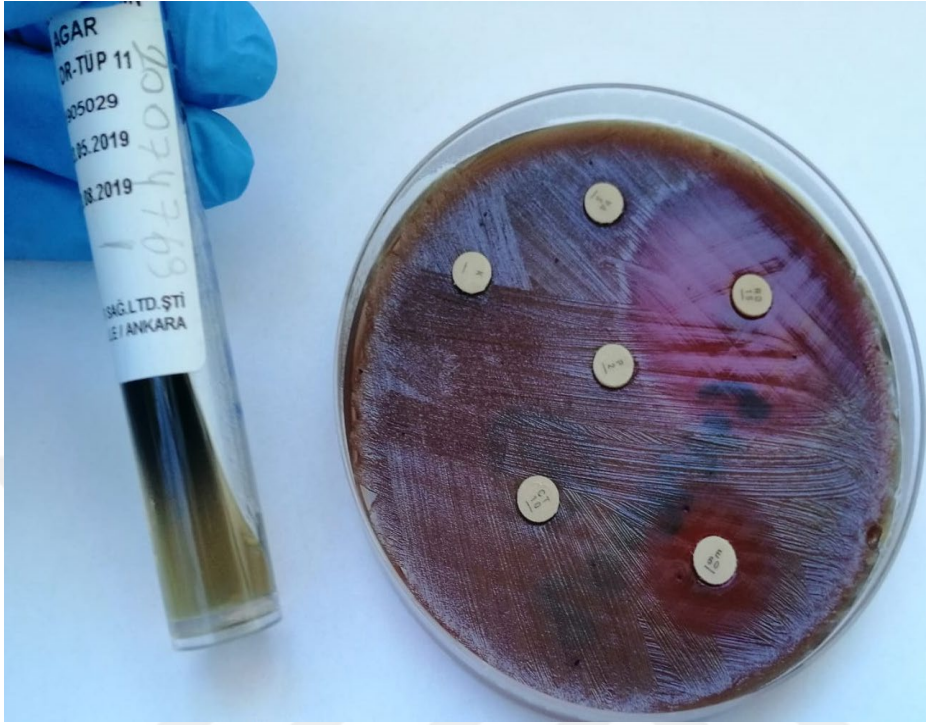
**Tablo 3.0.** Antibiyotik tanı diskleri ile anaerop bakterilerin ön identifikasyonu.

Bakteri	Eritromisin 60 µg	Rifampisin 15 µg	Kolistin 10 µg	Penisilin 2 ünite	Kanamisin 1000 µg	Vankomisin 5 µg
<i>Bacteroides fragilis</i>	S <sup>R</sup>	S	R <sup>S</sup>	R	R	R
<i>Prevotella melaninogenica</i>	S	S	V	S	R <sup>S</sup>	R
<i>Bacteroides oralis</i>	S	S	S	S	R	R
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	S	S	S	S	S	R
<i>Fusobacterium türleri</i>	R <sup>S</sup>	R <sup>S</sup>	S	S	S	R
Gram pozitif kok	S	S	R	S	S	S
Gram negatif Kok	S	S	S	S	S	R

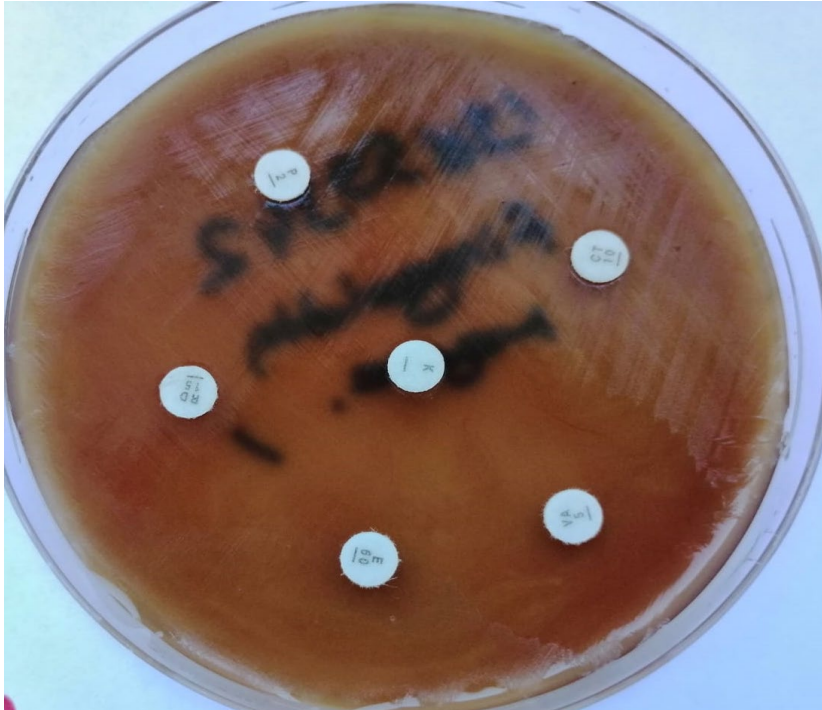
S: Duyarlı, S<sup>R</sup>: Genellikle dirençli, V: Değişken, R: Dirençli, R<sup>S</sup>: Genellikle duyarlı



**Resim 3.2.** Scheadler agara ekimi yapılan *Clostridium* spp.'nin AnIDENT (Oxoid) diskler ile vermiş oldukları zon çapları.



**Resim 3.3.** İzole edilen *Bacteroides fragilis* suşu; Solda BEA’da eskülin hidrolizine bağlı siyah renk değişimi; sağda antibiyotik tanı diskleri ile *B.fragilis*’in tanımlanması. (Çalışmamızdan)



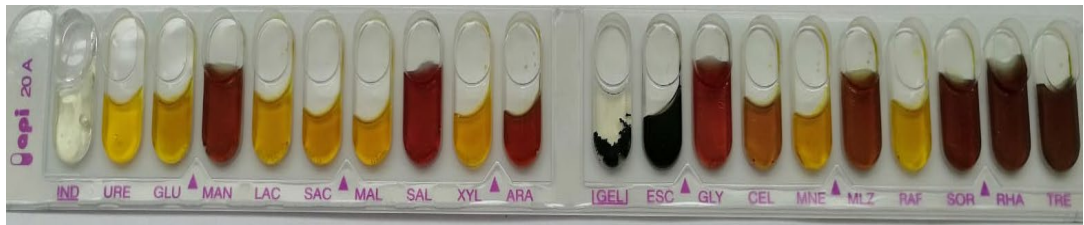
**Resim 3.4.** Antibiyotik tanı diskleriyle Gram pozitif kok olarak ön raporlanmış *Finegoldia magna* izolatı (Çalışmamızdan)

Ön değerlendirmeden sonra API 20 A (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) paneli (Resim 3.5.) ile identifikasyon yapılmış olup, bu panel bakterilerin aşağıdaki özelliklerini belirleyerek bakteri identifikasyonunun yapılmasına katkıda bulunmaktadır;

- İndol oluşturma ve üreaz aktivitesi
- Glikoz, mannitol, laktoz, sakkaroz, maltoz, salisin, ksiloz, arabinoz, gliserol, sellobiyoz, mannoz, melezitoz, rafinoz, sorbitol, ramnoz, trehalozdan asit oluşturmaları
- Jelatin ve eskülini hidrolize etmeleri
- Katalaz aktivitesi
- Hareket özelliği
- Floresans verme

Bakterinin Gram boyama özellikleri (kok, basil, pozitif, negatif, spor oluşumu varlığı gibi) de dikkate alınarak tanımlama yapılır.

Testin Yapılışı; Bu test yapılırken; taze ve saf kolonilerden öze ile alınarak API 20 A kitinin özel besiyerine (API 20 A medium) inoküle edildi, Vorteks yardımıyla homojenizasyon sağlandı ve McFarland 3 bulanıklığına ulaşacak şekilde bakteri süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonu steril enjektör yardımıyla mikro tüp denilen küçük bölmelerin hepsinin yarısını dolduracak şekilde (jel mikro tüp kuyucuğun tamamı dolacak şekilde) dağıtıldı. İndol testi için ayrılan kuyucuğun yarısına kadar hazırlanan bakteri süspansiyonundan kalan kısmına ise mineral yağ eklendi. 35-37 °C de anaerob şartlarda 24-36 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilmeye alındı. Değerlendirme işlemi üretici firma tarafından hazırlanan API 20 A kitapçığındaki değerlendirme tablosuna göre yapıldı.



**Resim 3.5.** İzole edilen *B. fragilis*' in API 20 A'da çeşitli biyokimyasal özellikleri gösterilmiştir.

### 3.3. İzole Edilen Anaerop Bakterilerde Antimikrobiyal Direncin Belirlenmesi

Çalışmamızda, ana plaklardan saflaştırma yapılarak pasajlanmış bakterilerin antimikrobiyal direncini belirlemek için piperasilin tazobaktam (Liofilchem, Italy), seftazolan–tazobaktam (Liofilchem, Italy), metronidazol (Biomerieux, Marcy l’Etoile, Fransa), penisilin G (Biomerieux, Marcy l’Etoile, Fransa) ve imipenem (Biomerieux, Marcy l’Etoile, Fransa), klindamisin ( Biomerieux, Marcy l’Etoile, Fransa) ve sefoksitin (Biomerieux, Marcy l’Etoile, Fransa) antibiyotiklerini içeren gradient strip testleri kullanılmıştır (**Tablo 3.1.**)

E-test antibiyotik stripleri üretici firma önerileri doğrultusunda uygulanmıştır. MİK değerleri üretici firmanın önerisine göre sefoksitin için CLSI M 11-A6’nın, diğer antibiyotikler için EUCAST Version 10.0 ( 2020) ‘in kabul ettiği MİK değerlerine göre okunmuştur (**Tablo 3.2.**) (**Resim 3.6.**)

**Tablo 3.1.** Çalışmamızda kullanılan E test striplerinin MİK aralıkları, kodları ve üretici firma bilgileri

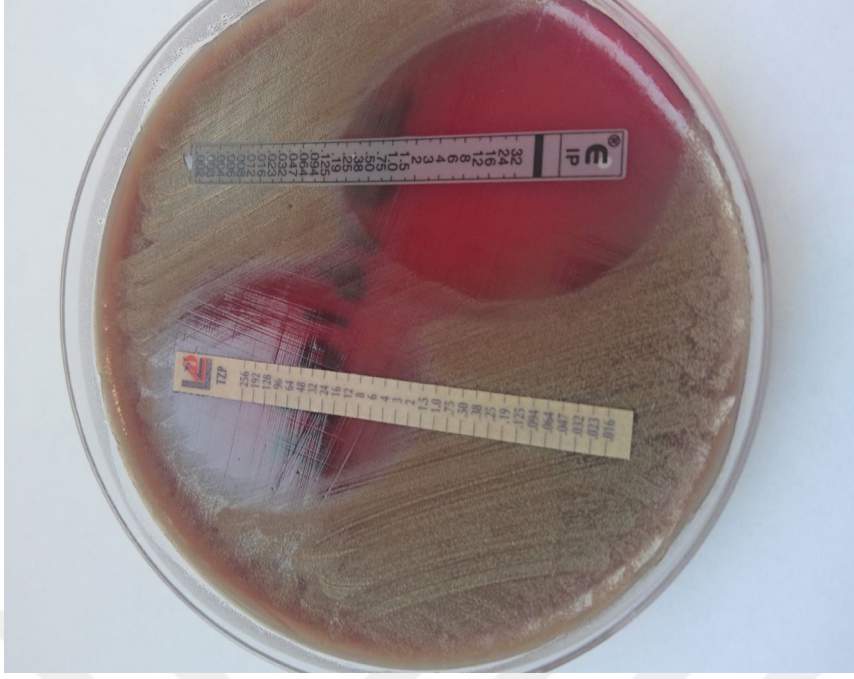
Antimikrobiyal madde	Kodu	MİK aralığı (ug/ml)	Üretici Firma
Benzilpenisilin	PG	0,002-32	bioMérieux, Fransa
Sefoksitin	FX	0,016-256	bioMérieux, Fransa
İmipenem	IP	0,02-32	bioMérieux, Fransa
Metronidazol	MZ	0,016-256	bioMérieux, Fransa
Klindamisin	CM	0,016-256	bioMérieux, Fransa
Piperasilin-tazobaktam	TPZ	0,016-256	Liofilchem S.r.l. Italy
Seftolozan-tazobaktam	C / T	0,016/ 4 - 256/4	Liofilchem S.r.l. Italy

**Tablo 3.2.** Kullanılan antibiyotikler için EUCAST veya CLSI’a göre klinik sınır değerler.

Antibiyotikler	S (<=)	R (>)
Benzilpenisilin*	0,25	0,5
İmipenem*	2	4
Metronidazol*	4	4
Klindamisin*	4	4
Piperasilin-tazobaktam*	8	16
Sefoksitin**	16	64

\*EUCAST’a göre değerlendirilmiştir.

\*\*Sefoksitin için MİK değeri EUCAST’ta bulunmadığından değerlendirme CLSI’a göre yapılmıştır.



**Resim 3.6.** Aynı kolonin E test ile antibiyotik duyarlılık testli  
(Çalışmamızdan *A. meyeri* / *odontolyticus* 3 günlük inkübasyon sonrası sarı parlak koloniler)

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya hastanemizin çeşitli kliniklerinden anaerop enfeksiyon şüphesiyle gönderilen 197 klinik numune dahil edildi. Örnekler incelenerek aerop ve anaerop kültürleri yapıldı. Kültür ekimleri yapılan bu örneklerin 115 (%58.4) 'inde bakteri üremesi gözlemlendi.

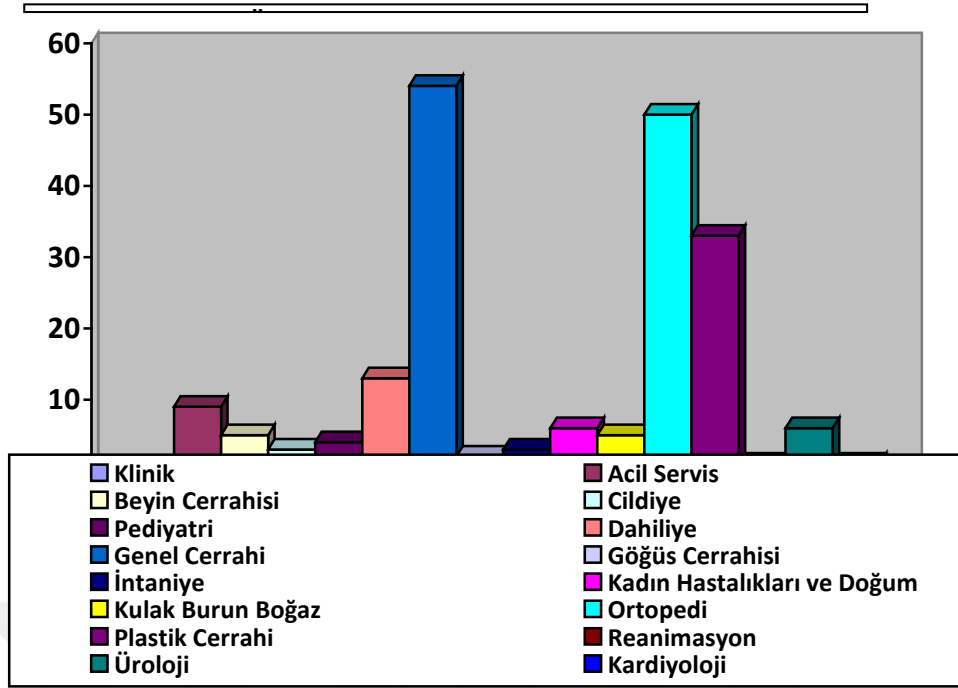
Anaerop kültür yapılan 197 örnekten üreme saptananların 22' sinde (% 11.2) sadece anaerop, 78'inde (% 39.6) sadece aerop/ fakültatif anaerop, 15'inde (% 7.6) hem aerop hem de anaerop üreme saptandı. Örneklerin 82 (% 41,6)'sinde üreme görülmedi.

Bu çalışmada en fazla anaerop bakteri izole edilen klinik numune grubunu sırasıyla apse (%37), drenaj (%15.2), ve biyopsi (%13) örnekleri izlemekteydi. Örneklerin türü ve üretilen aerop/anaerop bakteri dağılımları Tablo 4.1.'de verilmiştir. Çalışmaya alınan örneklerin geldiği kliniklere ilişkin veriler Şekil 1.'de gösterilmiştir.

Üreme saptanan örneklerden toplam 155 mikroorganizma izole edilmiş olup bunların 46 (%29,7) 'sı anaerop bakteri, 108 (% 69.7)'i aerop/ fakültatif anaerop bakteri ve 1'i *Candida* spp. idi.

Çalışmaya alınan 197 örneğin 37 (% 18,8) 'sinde anaerop bakteri üremesi gözlemlendi. Bu 37 örnekten toplamda 46 anaerop bakteri izole edildi. Örneklerin 9'unda birden fazla anaerop bakteri üremesi görüldü. Her bir anaerop üreme başına 1.2 adet anaerop bakteri üremesi oldu. Bu örneklerin 22'sinde (%11,2) sadece anaerop bakteri üremesi görülürken; 15'inde (%7.6) anaerop bakteriye ek olarak en az bir fakültatif anaerop bakterinin eşlik ettiği miks enfeksiyonlar şeklinde bakteri izolasyonu gerçekleşti. Miks üremenin görüldüğü 15 örneğin 4'ünde birden fazla fakültatif anaerop bakteri üremesi izlendi. Miks üremelerde anaerop etkene eşlik eden fakültatif anaerop bakterilerden en sık izole edilen sıklık sırasına göre; *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterokok* spp. olarak bulundu. Sadece aerop / fakültatif anaerop bakteri üremesi gözlenen örneklerde de en sık *E. coli* üremesi görüldü.

Üreme görülmeyen örneklerin 4'ünde Gram boyamada mikroorganizma görülmesine rağmen, bakteri üremesi görülmedi. Bir örnekte ise mikroorganizma görülmediği halde bakteri üremesi gözlemlendi.



Şekil 1. Çalışmaya alınan örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımları

**Tablo 4.1.** Çalışmaya alınan klinik örneklerin türü ve üretilen anaerop bakterilerin bu örneklerle göre dağılımı

Çalışmaya alınan örneğin türü	Çalışmaya alınan örnek Sayısı (%)	Sadece Anaerop bakteri izole edilen örnek sayısı (%)	Sadece fakültatif anaerop bakteri izole edilen örnek sayısı (%)	Miks* üreme görülen örnek sayısı (%)
Apse	72 (36,5)	6 (8)	30 (42)	11 (15)
Biyopsi	26 (13,2)	5 (19)	12 (47)	1 (4)
Bos	1 (0,5)	0	0	0
Drenaj	52 (26,4)	4 (7,7)	22 (42)	3 (5,8)
Kesi yeri	2 (1)	0	1 (50)	0
Periton sıvısı	7 (3,5)	2 (28,6)	0	0
Plevra sıvısı	5 (2,5)	2 (40)	0	0
Kan	2 (1)	2 /2	0	0
Sinoviyal sıvı	9 (4,6)	0	2	0
Yara kültürü	21 (10,7)	1 (4,8)	11 (52,4)	0
<b>Toplam</b>	<b>197</b>	<b>22</b>	<b>78</b>	<b>15</b>

\* Miks üreme: Fakültatif anaerop ve anaerop bakterinin birlikte izole edildiği örnek.

Çalışmamızda 37 klinik örnekten 46 anaerop bakteri izole edildi. 46 anaerop etkenin 44'ünde API 20A veya Vitek ANC kartların en az biriyle tanımlama yapıldı (Tablo 4.2.). İzole edilen 46 anaerop bakterinin 41'inde her iki sistemle identifikasyon sağlandı. API 20A tarafından tanımlanamayan 1 izolat; ANC kart tarafından '*Lactobacillus hilgardii*' olarak tanımlandı. Vitek ANC kart tarafından tanımlanamayan 2 izolat ise API 20A tarafından '*B.fragilis*' ve '*Fusobacterium nucleatum*' olarak tanımlandı. Bu iki sistem ile de

belirlenemeyen 2 suşun tanımlanmasında ise geleneksel yöntemlerden faydalanıldı. İzolatlar sırasıyla ‘Gram pozitif anaerob kok’ ve ‘Gram pozitif anaerob basil’ olarak belirlendi.

Her iki panelle de tanımlanamayan 2 izolatı göz ardı ettiğimizde API 20A ve Vitek ANC kartın anaerob bakteri tanımlamasındaki cins düzeyindeki uyumu 35 /44 (%79,5) olarak saptandı. Cins düzeyinde uyumlu olan 35 suşun 19 (%54,3)’unda tür düzeyinde de uyumluluk söz konusu idi. Cins düzeyinde uyumluluğu olan ama tür düzeyinde uyumun olmadığı 16 anaerob bakteri gözlemlendi. Saptanan uyumsuzluğun 6’ında iki ticari sistemin de farklı türleri işaret etmesinden kaynaklandığını (Tablo 4.3.); 10 izolatta ise sistemlerden en az birinin tür düzeyinde ayırım yapamamasından kaynaklı uyumluluk saptanmadı.

**Tablo 4.3.** API 20A ve Vitek ANC ile cins düzeyinde uyumsuzluk saptanan izolatlarla ilişkin sonuçların Konvansiyonel yöntemler ile uyumu.

API 20A	API-20A ile Konvansiyonel yöntemlerin uyumu*	VITEK 2	VITEK 2 ile geleneksel yöntemlerin uyumu
<i>Streptococcus constellatus</i>	yok	<i>Peptoniphilus spp.</i>	var
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	var	<i>Anaerococcus prevotii</i>	var
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	var	<i>Fingoldia magna</i>	var
<i>B.fragilis</i>	var	<i>Clostridium clostriforme</i>	yok
<i>B.fragilis</i>	var	<i>P.disiens</i>	yok
<i>B.fragilis</i>	var	<i>P.oralis</i>	yok

\*Konvansiyonel yöntemler: Gram boyama, koloni morfoloji özellikleri, BEA’da üreme, AnIDENT disk testi, katalaz, indol vb. biyokimyasal testler

**Tablo 4.2.** Çalışmamızda İzole edilen anaerop bakterilerin API 20A ve Vitek 2 ANC sistem ile identifikasyonuna ait karşılaştırılmalı sonuçları

<b>API 20A</b>	<b>VITEK 2</b>
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
<i>Actinomyces meyeri / odontolyticus</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>
<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Peptoniphilus</i> spp.
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	<i>Clostridium clostriforme</i>
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Peptostreptococcus anaerobicus</i>
<i>Prevotella intermedia / disiens</i>	<i>Prevotella disiens</i>
Tanımlanamadı	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Actinomyces meyeri / odontolyticus</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
<i>Prevotella intermedia / disiens</i>	<i>Prevotella disiens</i>
<i>Clostridium tertium</i>	<i>Clostridium tertium</i>
<i>Prevotella intermedia / disiens</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Anaerococcus prevotii</i>
<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Clostridium clostriforme</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	tanımlanamadı
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Fingoldia magna</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Clostridium clostriforme</i>
<i>Clostridium clostriforme</i>	<i>Clostridium group</i>
<i>B.fragilis</i>	<i>Prevotella disiens</i>
<i>Veionella parvula</i>	<i>Veionella parvula</i>
Tanımlanamadı	Tanımlanamadı
<i>Prevotella melaninogenica / oralis</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Prevotella oralis</i>
<i>Actinomyces meyeri / odontolyticus</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
<i>Prevotella melaninogenica / oralis</i>	<i>Prevotella oralis</i>
<i>Prevotella bivia</i>	<i>Prevotella bivia</i>
<i>Bacteroides ovatus / thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides stercoris</i>
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Peptostreptococcus anaerobicus</i>
<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>
<i>Clostridium beijerinckii/ butyricum</i>	<i>Clostridium bifermentans</i>
Tanımlanamadı	Tanımlanamadı
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
<i>Clostridium</i> spp.	<i>Clostridium innocuum</i>
<i>Clostridium innocuum</i>	<i>Clostridium innocuum</i>
<i>Prevotella intermedia / disiens</i>	<i>Prevotella disiens</i>
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	tanımlanamadı
<i>Clostridium botulinum / sporogenes</i>	<i>Clostridium bifermentans</i>
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Peptostreptococcus anaerobicus</i>
<i>Clostridium tertium</i>	<i>Clostridium tertium</i>

İzolasyonu yapılan 46 suşun 44'üne gradiyent strip test (Etest; biomeriux, Fransa) yöntemi uygulanarak antibiyotik duyarlılık testi uygulandı. Antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına ilişkin veriler **Tablo 4.4.**'de özetlenmiştir. Gram boyanma özelliklerine göre gruplanan bakterilerin antibiyotik duyarlılık oranları **Tablo 4.5.**'te verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Tanımlanan anaerop bakterilerin antimikrobik duyarlılık oranları.

	Üreyen Anaerop bakteri sayısı n (%)	PG (%)	FX (%)	İP (%)	MZ (%)	CM (%)	TPZ (%)	C / T MIC* <sub>50</sub>
<i>Actinomyces spp.*</i>	5	4 (80)	5 (100)	5 (100)	0 (0)	2 (40)	5 (100)	6
<i>Bacteroides fragilis</i>	4	0 (0)	2 (50)	4 (100)	3 (75)	3 (75)	4 (100)	2
<i>Bacteroides ovatus / thetaiotaomicron</i>	1	0 (0)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	8
<i>Clostridium beijerinckii/ butyricum</i>	2	0 (0)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	0,032
<i>Clostridium tertium</i>	2	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1
<i>Clostridium innocuum</i>	2	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	1 (50)	6
<i>Clostridium clostriforme</i>	2	0 (0)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	1 (50)	2
<i>Clostridium bifermentans</i>	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	2
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	1	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	8
<i>Peptostreptokok spp.</i>	10	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	6 (60)	10 (100)	2
<i>Peptoniphilus assacchorolyticus</i>	4	2 (50)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	2 (50)	4 (100)	1
<i>Prevotella intermedia / disiens</i>	4	3 (75)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	3 (75)	4 (100)	2
<i>Prevotella melaninogenica / oralis</i>	2	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	2 (100)	2
<i>Prevotetella bivia</i>	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	2
<i>Fusobacterium spp.</i>	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0,5
<i>Streptococcus consellatus</i>	1	0 (0)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	6
<i>Veionella parvula</i>	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0,25
<b>Toplam</b>	44	27 (61,4)	41 (93,2)	44 (100)	37 (84,1)	29 (65,9)	41 (93,2)	2

n: Örneklerde üreyen bakteri sayısını göstermektedir

PG: Penisilin G FX: Sefoksitin İP: İmipenem MZ: Metronidazol

CM: Klindamisin TPZ: Piperasilin / Tazobaktam C/T: Seftolozan tazobaktam

MIC<sub>50</sub>: İzolatların %50'sinde üremeyi baskılama etkinliği olan konsantrasyon

\*metranidazole doğal dirençli

**Tablo 4.5.** Tanımlanan anaerop bakterilerin Gram boyanma özelliklerine göre gruplamada antimikrobik duyarlılık oranları

	Üreyen Anaerop bakteri sayısı n (%)	PG (%)	FX (%)	İP (%)	MZ (%)	CM (%)	TPZ (%)	C / T MIC* <sub>50</sub>
<b>Gram pozitif kok</b>	15 (34.1)	12 (80)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	9 (60)	15 (100)	2
<b>Gram pozitif sporlu basil</b>	9 (20.5)	4 (44)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	7 (78)	7 (78)	2
<b>Gram pozitif sporsuz basil</b>	6 (13.7)	4 (67)	5 (83)	6 (100)	0* (0)	3 (50)	5 (83)	6
<b>Gram negatif kok</b>	1 (2.3)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0,25
<b>Gram negatif basil</b>	13 (29.5)	6 (46)	11 (85)	13 (100)	12 (92)	9 (69)	13 (100)	2
<b>Toplam</b>	44 (100)	27 (61.4)	41 (93.2)	44 (100)	37 (84.1)	29 (65.9)	41 (93.2)	2

\*Gram pozitif sporsuz basillerden *Actinomyces* spp. metranidazole doğal dirençli

## 5. TARTIŞMA

İnsan endojen mikroflorasının baskın komponentleri arasında yer alan anaerop bakteriler, vücudumuzun çeşitli anatomik bölgelerinde yaygın olarak flora bakterileri olarak bulunmakta olup hayati tehdit edebilen ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedirler. Bu sebeple anaerop patojenlerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık profillerinin bilinmesi tedavi için oldukça önemlidir. Ancak anaerop bakteriler için kullanılan izolasyon ve identifikasyon aşamaları, aerop bakteriler için uygulanan rutin laboratuvar iş akışından oldukça farklıdır ve özellik arz eder (Nagy ve ark. 2018).

Başarılı anaerop bakteriyoloji çalışmaları için örneğin işlenmesi kadar numunenin alımı, transport koşulları ve süresi de dikkat edilmesi gereken hususlardır. Bu sebeple laboratuvar-klinik iş birliği sağlanmalıdır. Anaerop enfeksiyonlar endojen floradan kaynaklı ve genellikle buldukları anatomik bölge ilişkilidir. Klinik-laboratuvar işbirliğiyle bakteri morfoloji görünümüleri ve Gram boyama özelliklerinden de faydalanılarak flora ilişkili ‘olası anaerop enfeksiyon etkeni’ ön görülebilir (Gajdacs ve ark. 2017)

Anaerop patojenin izolasyon, identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık çalışmaları zahmetli ve zaman alıcıdır. Ayrıca pekçok laboratuvarın alt yapısı anaerop bakteriyoloji çalışmaları için yetersizdir. Bu da bölgesel verilerin eksik kalmasına neden olmaktadır. Ancak anaerop patojenin eldesine yönelik iş akışının emek ve zaman gerektirmesine karşın; kültür gold standart olma özelliğini korumaktır. Kültür çalışmalarının antibiyotik duyarlılık verilerinin izlenmesine de olanak sağlaması; gerek ampirik tedavi protokollerinin düzenlenmesinde gerek yeni ortaya çıkan direnç özelliklerinin takibinde sıkça kullanılmaktadır (Jousimies-Somer ve ark. 2002).

Anaerop kültür çalışmalarını etkin bir şekilde uygulayan laboratuvarlarda % 25 ile % 50 arasında değişen oranlarda anaerop bakterilerin izole edildiği bildirilmektedir. Örnek alımı ve taşınması, besiyeri seçimi, besiyeri kalitesi ve inkübasyon koşulları gibi aşamaların ve faktörlerin optimum düzeyde tutulması klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında anaerop bakterilerin izole edilebilme başarısını arttırmaktadır (Türkkan2008). Çalışmamızın başlarında hazır besiyerleri kullanıldığında özellikle Gram negatif anaerop bakterilerin izolasyon oranlarının

düşük seyretmesi üzerine besiyerlerimizi laboratuvarımızda günlük hazırlayıp; taze kullanarak bu sorunun üstesinden geldiğimizi belirtmek isteriz.

Taştekin N (1998) tez çalışmasında 160 klinik numuneden yapılan kültürde 49 (% 31) 'unda üreme görülmediğini; üreme görülen 111 kültürün 48 (% 43)' inde sadece aerop bakteri, 31' inde sadece anaerop bakteri (%28) ve 32 (%28)'sinde anaerop ve aerop bakterinin birlikte ürediğini saptamıştır (Taştekin 1998).

Erciş ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada inceledikleri 394 klinik örnekten 120' sinde (%32.7) hiçbir üreme olmazken; 28 (%7.6) örnekte sadece anaerop, 75 (%20.5) örnekte ise aerop ve anaerop bakteriler birlikte izole etmiştir. Anaerop bakteri üremesi saptanan 103 klinik numuneden 217 anaerop bakteri izole edilmiş olup; numunelerin 15' inde tek, 88' inde ise fakültatif anaerop/anaerop mikts olarak birden fazla bakteri üremesi görülmüştür.

Uysal ve ark. (2014) anaerop enfeksiyon şüphesiyle gelen 543 örneğin kayıtlarını retrospektif olarak incelemiştir. Numunelerin 134' ünde (%24.6) çeşitli anaerop bakterilerin ürediği, 409 örnekte (%75.3) üreme görülmediği saptanmıştır (Uysal ve ark. 2014).

Kaya S tez çalışmasında (2012), 296 klinik örnek inceleyerek; 11 (% 3.7)'sinde anaerop / fakültatif anaerop bakterin mikts ürediğini, örneklerin 15'inde (% 5) ise sadece anaerop bakterilerin ürediğini saptamıştır.

Şengöz ve ark. (2005) tarafından 1503 anaerop klinik şüpheli materyal inceleyerek yapılan çalışmada 127 (%8.5) anaerop bakteri ürediğini saptamıştır. En sık anaerop bakteri izole edilen örnek batın içi abse ( %29. 1) olmuştur ( Şengöz ve ark. 2005 ).

Doğan M (2008) tez çalışmasında, fakültemizden 100 klinik örnek inceleyerek; örneklerin 63 (%63)' ünde üreme olmadığını, 15 (%15)' inde sadece aerop, 8 (%8)' inde ise anaerop ve fakültatif anaeroplara beraber ürediğini, 14 (% 14)'ünde ise sadece anaerop üreme olduğunu saptamıştır.

Saat N (2018) tez çalışmasında, 357 klinik örneği inceleyerek bu örneklerin 45' inde (% 12. 6) sadece anaerop, 89'unda (% 24.9) sadece aerop / fakültatif anaerop, 19'unda (% 5.3) hem aerop hem de anaerop üreme saptamıştır. Örneklerin 204 (% 57. 1)' inde ise üreme olmamıştır. Saat N (2018) bu çalışmada anaerop üreme saptanan 64 örnekten 95 adet anaerop bakteri izole etmiş olup; her bir anaerop üreme başına 1.2 adet anaerop bakteri üremesi saptamıştır.

Çalışmamızda ise 197 klinik örnek anaerop bakteri açısından incelendi. Çalışmamızda 197 örneğin 22' sinde (% 11.2) sadece anaerop, 78'inde (% 39.6) sadece aerop/ fakültatif anaerop, 15'inde (% 7.6) hem aerop hem de anaerop üreme saptandı. Örneklerin 82 (% 41.6)'sinde üreme görülmedi. Anaerop enfeksiyon şüphesiye işleme alınan kültürlerin 37 (% 18.8)'sinde anaerop üreme oldu. Anaerop üreme gözlenen 37 örnekten 9' unda birden fazla anaerop bakteri üremesi saptandı. Bu çalışmada toplamda 46 anaerop bakteri soyutlandı. Her bir anaerop üreme başına 1.2 adet anaerop bakteri üremesi oldu. Buna göre bizim çalışmamızda elde edilen bu oranlar ülkemizdeki diğer çalışmalara benzer bulunmuştur.

Kaya S. (2012) tez çalışmasında anaerop bakterilerin tanımlanmasında API 20A (Anaerobe Phenotypic Identification, BioMerieux, France) panel sistemini, antibiyotik duyarlılık testi için agar dilüsyon yöntemini kullanmıştır. Soyutlanan anaerop bakterilere ait örneklerin daha çok apse (%21,6) numunelerinden oluştuğunu belirtmiştir.

Anaerop bakterilerin izole edildiği vücut örnekleri incelendiğinde; Saat N (2018) 95 anaerop bakteri ürettiği tez çalışmasında en fazla üremeyi apse örneklerinden elde ettiklerini bildirmiştir. Yine Doğan ve ark. (2010) 22 anaerop bakteri üremesinden 13'ünü, Şengöz ve ark. (2005) 127 anaerop üremenin 61'ini, Ercis ve ark. (2005) 217 anaerop üremenin 102'sini, Kiremitçi ve ark (2008) 33 anaerop üremeden 15'ini apse örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da en fazla anaerop bakteri izole edilen örnek grubunu apse (%37) örnekleri oluşturmaktaydı. Bunu sırasıyla drenaj (%15.2) ve biyopsi (%13) örnekleri izlemekteydi. Ancak örnek başına anaerop bakteri izole etme oranlarına baktığımızda biyopsi örneklerinde (%23.1), drenaj örneklerine (%13.5) göre daha fazla anaerop bakteri soyutlandığı saptandı. Apsel örnekleri ise örnek başına düşen anaerop izole etme oranında (%23.6) da ilk sırada yer aldı.

Çalışmamızda kan (2/2) , plevra (2 /5) ve periton (2/7) örneklerinde de örnek başına anaerop izole etme yüzdesi fazla oldu ancak örnek sayılarının az olmasından dolayı bu örnek türleri için genellemenin yapılamayacağı kanaatine varıldı. BOS ve sinoviyal sıvı numunelerinde ise anaerop bakteri üremesi görülmedi.

Demir C tez çalışmasında (2015) 278 örnekten toplam 107 (% 38.7) fakültatif bakteri izoe etmiş; 8 adet örnekte ise iki farklı fakültatif anaerop bakteri

tanımlamıştır. İlgili çalışmada bu miks enfeksiyonlarda en sık soyutlanan fakültatif anaerop bakteriler; *E.coli* ve *Klebsiella spp.* olarak bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise gangrenöz ve perfore apandisit vakalarından izole edilen anaerop bakterilere, en sık olarak *E.coli*'nin eşlik ettiği gözlenmiştir ( Bennion ve ark, 1990).

Bu çalışmada ise örneklerin 15 (% 7.6)'inde anaerop bakterilere fakültatif anaerop bakterilerin eşlik ettiği miks enfeksiyon şeklinde bakteri üremelerine rastlandı. Miks üremenin görüldüğü 15 numunenin 4'ünde birden fazla fakültatif anaerop bakteri üremesi izlendi. Miks bakteri üremelerinde anaerop etkene eşlik eden fakültatif anaerop bakterilerden en sık izole edilenler sıklık sırasına göre; *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterokok spp.* olarak saptandı. Çalışmamızdaki bu verilerin yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olduğunu saptadık.

Çalışmamızda Gram boyada mikroorganizma görülmesine rağmen bakteri üremesi görülmeyen örnek sayısı 4 idi. Bu örnekler tiyoglikolatlı geri dönüş sıvısından tekrar ekim yapıldı. Ancak üreme görülmedi. Örneklerin tümünde tiyoglikolatlı besiyerlerinde yapılan Gram boyamalarda fusiform yapıda Gram negatif bakteriler görüldü değerlendirme sonucu rapor edildi. İlgili klinikler ile konuşularak anaerop şartlarda yeni örnek istemi yapıldı. Ancak yeni örneklerden yapılan anaerop kültürlerde de üreme olmadı. Yeni örneklerden olan ekimlerde üremenin olmaması hastaların ampirik antibiyoterapiye başlanması ile ilişkilendirildi.

Bu örneklerle ilgili olarak en başta bakteri üremesinin görülmeyişini; örneğin alınma ya da taşınma sırasında anaerop koşullara uyulmaması sebebiyle meydana geldiğini düşünmekteyiz. Bu durum fusiform Gram negatif basiller gibi oksijene son derece hasas olan anaerop bakterilerin örnekten izolasyon şansını oldukça düşürmektedir. Klinisyen ile birebir görüşülerek örneklerin alınması ve laboratuvara transportu sırasında dikkat edilecek hususlar dile getirildi. Klinik-laboratuvar işbirliğinin anaerop enfeksiyon etkenlerinin klinik örneklerden izolasyon şansını arttıracığı vurgulanmıştır.

Anaerop bakterilerin tanımlanmasında bakterilerin kültür besiyerinde ve Gram boyamalarında morfolojik görüntüleri ve pigment durumlarının incelenmesine ek olarak bazı biyokimyasal testlerin incelenmesi yardımcı olmaktadır ( Jousimies-Somer ve ark. 2002).

Demir C. (2015) tez çalışmasında, anaerop üreme olan örneklerde en çok *B.fragilis* grup (%50), ikinci sıklıkta *Prevotella* spp.(%32,1), üçüncü sıklıkta *Fusobacterium* spp. (%17,9) klinik örneklerden soyutlamıştır.

Şengöz ve ark. (2005) 1503 klinik örnekten 127 anaerop bakteri izole ettiği çalışmada en sık soyutlanan anaerop bakteri % 47.2 oranı ile *Bacteroides* spp. olup; ikinci sıklıkta *Peptostreptococcus* spp. izole edilmiştir.

Saat N (2018) tez çalışmasında kültürlerden izole edilen anaerop etkenlerin %72.8' ini Gram pozitif anaeroplara, % 27.2'ini Gram negatif anaeroplara tarafından oluşturduğunu bildirmiştir. İlgili çalışmada Gram pozitif anaeroplardan en sık *Propionibacterium* spp. (10), ikinci sıklıkta *Actinomyces* spp. (8) izole edilirken; Gram negatif anaeroplardan ise en fazla *B.fragilis* grup (5) ve *Prevotella* spp. soyutlamıştır.

Doğan ve ark. (2010) yaptığı tanımlama çalışmasında, izole ettiği 22 anaerop bakterinin, 10' unun (% 45) *Bacteroides* spp. olduğunu, 7 tanesinin (% 32) ise Gram pozitif anaerop bakteri (5 *Peptostreptococcus* grup, 2 *P.niger*) olduğunu bildirmiştir. Boyanova ve ark (2006) 118 hastaya ait baş-boyun apse örneklerinde en sık *Prevotella* spp. (n=49), daha sonra sıklık sırasına göre *Fusobacterium* spp. (n=22), *Actinomyces* spp. (n=21), anaerobik kok (n=20) ve diğer bakterileri izole etmişlerdir.

Yayınlanan çalışmalarda da bahsedildiği gibi, enfeksiyonun yerine göre soyutlanan bakteri cinsi değişmekle birlikte en sık izole edilen anaerop bakteri grubunu Gram negatif anaeroplardan *B.fragilis* grup ve *Prevotella* spp.; Gram pozitif anaeroplardan ise *Peptostreptococcus* spp., *Actinomyces* spp. ve *Clostridium* spp. oluşturmaktadır.

Bizim çalışmamızda soyutlanan 46 anaerop izolatın % 69,6'sını Gram pozitif anaeroplara, %30,4 ünü gram negatif anaeroplara oluşturmaktaydı. Gram pozitif anaeroplardan en sık *Peptostreptokok* spp. (10), ikinci sıklıkta *Clostridium* spp. (9) soyutlanmıştır. Gram negatif anaeroplardan ise en fazla *Prevotella* spp. (7) ve *B.fragilis* grup (5) izole edilmiştir.

Anaerop bakterilerin tanımlanmasında koloni morfolojisi, bakterinin Gram boyanma ve mikroskopi özellikleri, biyokimyasal testlere reaksiyonu, pigment oluşumu gibi özellikler rutin her laboratuvarında değerlendirilebilecek testlerdendir.

Bunun dışında antibiyotik tanımlama diskleri anaerop bakterilerin cins düzeyinde tanımlanmasında faydalı, pratik testlerdendir.

Anaerop bakterilerin biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanmasında kullanılmak üzere ticari yarı otomatize kart ve paneller bulunmaktadır. Çoğu cins düzeyinde güvenilir sonuç verebilen bu panellerin duyarlılığı sistemden siteme değişmektedir. Sistemlerin karşılaştırmasında bakteri identifikasyonunda 'altın standart yöntem' olarak görülen 16s rRNA gen analizi için pek çok laboratuvarın gerekli alt yapısı bulunmamaktadır. Öte yandan Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı-kütle spektrometresi (MALDI TOF MS), anaerop bakterilerin tanımlanmasında hızlı, pratik oluşu yüksek doğruluk oranları ile umut vadetmektedir (Rodríguez-Cavallini ve ark. 2011). Ancak cihazın pahalı oluşu ve veri tabanının geliştiriliyor olması dejavantajlarındandır.

Çalışmamızda anaerop bakterilerin tanımlanmasında koloni morfolojisi, pigment oluşumu, safra eskülin hidrolizi, Gram boyama ve mikroskopi özellikleri (spor oluşumu, dallanma vb.), katalaz reaksiyonu gibi temel testlerin yanında antibiyotik tanımlama testlerinden (ANIDENT, Oxoid) faydalanarak geleneksel yöntemlerle identifiye etmeye çalıştık. Tanımlama çalışmalarında API 20A panel ve Vitek 2 ANC kart ile de eş zamanlı olarak kullandık. Yöntemler arası uyumu cins ve tür düzeyinde değerlendirdik.

Buna göre 46 anaerop bakteriden 44' ünde API 20A veya Vitek ANC kartlar ile en az cins düzeyinde identifikasyonu sağlandı. İzolatların 41'inde ise; her iki sistem ile de tanımlama yapıldı. Vitek ANC kart tarafından tespit edilemeyen 2 izolat API 20A tarafından *B.fragilis* ve *Fusobacterium nucleatum* olarak identifiye edildi. API 20A tarafından tanımlanamayan 1 izolat ise; Vitek 2 ANC kart tarafından '*Lactobacillus hilgardii*' olarak tespit edildi. Her iki sistem ile de belirlenemeyen 2 suşun tanımlanmasında ise geleneksel yöntemlerden faydalanıldı. İzolatlar sırasıyla 'Gram pozitif anaerop kok', 'Gram pozitif anaerop basil' olarak belirlendi.

Her iki panelle de identifiye edilemeyen 2 izolatu göz ardı ettiğimizde API 20A panel ve Vitek 2 ANC kartın anaerop bakteri tanımlamasındaki cins düzeyindeki uyumu 35 /44 (%79,5) olarak; cins seviyesinde uyumlu olan 35 suşun 19' (%54,3)'unda tür düzeyinde de uyumluluk söz konusu idi.

Wang Y ve ark. (2019) ları tarafından yapılan çalışmada anaerop bakteri tanımlamasında Vitek 2 ANC yarı otomatize sistemle 16sRNA sekans analizi

karşılaştırılmış. 16s rRNA yönteminin referans metod olarak değerlendirildiği çalışmada 137 adet *B.fragilis* gruba ait anaerop bakteri ele alınmış; *Bacteroides intestinalis*' in veri tabanında olmamasına rağmen Vitek 2 ANC kart tarafından *B.ovatus* olarak yanlış tanımlanmış olduğu bildirilmiştir. *B.fragilis* olan iki izolatın Vitek 2 ANC tarafından *B.stercoris* olarak yanlış tanımlandığı; *Parabacteroides distasonis* olan izolatın ise *B.uniformis* olarak yanlış tanımlanmış olduğu saptanmıştır.

Park GC ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada (n=35) anaerop bakterilerin identifikasyonda kullanılan fenotipik yöntemlerden API 20A ve Vitek ANC kart yarı otomatize sistem ile referans 16s rRNA yöntemi karşılaştırılmıştır. İlgili çalışmada Vitek 2, API20A ve 16s rRNA gen sekans analizi ile sırasıyla % 54.3; % 15.4; % 94.3 olarak tür düzeyinde doğru tanımlama yaparken; cins düzeyinde % 77.1; % 42.3 ve %100 oranlarında identifikasyon sağlandığı bildirilmiştir. Tür düzeyinde tanımlamada üç yöntem arasında anlamlı farklılık saptanmıştır.

Rennie RP ve ark. (2008) tarafından yapılan 365 klinik anaerop izolatı içeren çalışmada tanımlamada kullanılan Vitek 2 ANC yarı otomatize sistemin performansı 16s rRNA yöntemi ile karşılaştırılmıştır. ANC kart izolatların % 95.1 (347 / 365)'ini doğru tanımlamıştır. İzolatların 17 (%4.6)'si ANC kart tarafından yanlış tanımlanırken; 1 suşun tanımlaması yapılamamıştır. ANC tarafından yanlış tanımlanmış 17 suşun 14'ünde cins düzeyinde tanımlama doğru şekilde yapılırken; 3 izolatta cins seviyesinde de yanlış identifikasyon mevcuttur. ANC tarafından cins düzeyinde yanlış tanımlama olan izolatların ikisi *Actinomyces naeslundii* olarak isimlendirilmiş fakat 16s rRNA yöntemiyle *Bifidobacterium spp.* *Propionibacterium spp.* olarak tanımlanmıştır. 16s rRNA sekans analizi ile *C.clostriforme* olarak tanımlanan 1 suş ise ANC kart ile *F.nucleatum* olarak tanımlaması yapılmıştır. Tür düzeyinde yanlış tanımlamanın yapıldığı izolatların 6'sı *C.perfringens* dışı *Clostridium* türü izolatların olduğu bildirilmiştir.

API 20A ve Vitek 2 ANC kart arasında cins düzeyinde uyumsuzluk saptanan 6 izolat geleneksel yöntemlerde dikkate alınarak tekrar değerlendirildi. Buna göre API 20A-geleneksel yöntem uyumu 6 izolatın 5'inde görülürken; ANC kart-geleneksel yöntem uyumu 3/6 izolatta görüldü. API 20A ve geleneksel yöntemlerle tam uyum gösteren ancak ANC kartın uyumsuz sonuç verdiği 4 izolatı inceledik. Bu 4 izolatın 3'ünde API20A'nın ve ANIDENT disklerin '*B.fragilis*' olarak tanımlanmış olduğu, eskülin hidrolizini de tespit ettiğimiz bu izolatların; ANC kart tarafından *C.clostriforme*, *P.disiens* ve *P.oralis* olarak tanımlandığını saptadık. *B.fragilis* gibi

klirik izolatlarda sıklıkla karşılaşılan ve virülans özellikleri fazla olan anaerob bakteri türünün Vitek 2 ANC kart sistemi tarafından yanlış tanımlanmasının dikkate değer olduğunu düşünmekteyiz. *B.fragilis* izolatlarını tanımlamasında ANC kartın kategorik uyumsuzluğunu saptamış benzer çalışmalar bulunmaktadır (Wangy ve ark. 2019). ANC kart tarafından uyumsuz identifiye edilen ancak olası *B.fragilis* düşünülen izolatlara başka bir ticari yöntem ya da ek konvansiyonel metodların uygulanması gerektiği kanaatindeyiz.

API 20A tarafından *Streptococcus constellatus* verilen izolatin ise Vitek ANC kart tarafından *Peptoniphilus* spp. olarak identifiye edildiğini saptadık. İlgili suşun antibiyotik duyarlılık profiline baktığımızda metronidazole duyarlı olduğunu tespit ettik. *Streptococcus constellatus* gibi pek çok mikroaerofilik streptokok türünün ise metronidazole dirençli olduğu bilinmektedir.(Brook 2016b).

Anaerob antibiyotik duyarlılık test metodlarından agar dilüsyon yöntemi referans metod olarak kabul görmektedir. Fakat bu metod zahmetlidir ve rutin kullanım için pratik değildir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ise *B.fragilis* grup için onay almıştır. Çalışmamızda kullandığımız metod olan ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı almış gradiyent test (E test) ise diğer yöntemlere kıyasla pahalı olmakla birlikte, izolat sayısının az olduğu laboratuvarlarda kullanılması önerilen, pratik ve güvenilir bir yöntemdir (Saat 2018).

Anaerob bakteriler arasında çeşitli antimikrobiyallere karşı duyarlılığın azaldığını bildiren yayınlar mevcuttur. Demir C. (2015) tez çalışmasında en yüksek direnç oranları sırasıyla penisilin (% 78,5) ve sefoksitinde (%21,4) görülmüştür. Klindamisine direnç en fazla *B.fragilis* klinik suşlarında (%28,5) olarak bildirilmiştir. *B.fragilis* suşlarının hiçbirinde metronidazol direnci saptanmamıştır.

Ülger TN ve ark. (2005) tarafından 100 *B.fragilis* izolatu ile yaptığı çalışmada, suşların tamamı amoksisilin klavulonat, imipenem ve metronidazole duyarlı bulunmuştur. 2013 yılına gelindiğinde aynı merkezde saptanan ilk metronidazol dirençli *Bacteroides thetaiotaomicron* izolatu Ülger TN ve ark (2013) tarafından bildiri yapılmıştır.

Uzunkaya Ö. (2015) tez çalışmasında *B.fragilis* (48) ve *Bacteroides fragilis* dışındaki BFG suşlarını içeren toplamda 66 klinik izolatin hiçbirinde metronidazol direnci saptanmamıştır. *Bacteroides fragilis* kökenlerinin % 10'unu meropeneme, % 8'i ise imipeneme dirençli bulunurken; *Bacteroides fragilis* dışındaki BFG bakterilerde karbapenemlere direnç tespit edilmemiştir.

Jeverica ve ark (2017) yaptığı çalışmada *B.fragilis*, % 27'si klindamisine, % 99'u penisiline ve % 1'i imipeneme dirençli bulunmuştur. *B.fragilis* izolatlarının, non-*B.fragilis* izolatlarına göre klindamisine ve amoksisilin klavulonata daha dirençli oldukları, imipeneme daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *B.fragilis* grup izolatlarından hiçbirinde metronidazole direnç tespit edilmemiştir.

Keşli (2001) tez çalışmasında 40 anaerop bakteri için klindamisin, sefoksitin, imipenem, metronidazol, penisilin, piperasilin / tazobaktama karşı direnç oranları gradient test yöntemi araştırılmıştır. Direnç oranları Gram pozitif bakteriler (n=24) için sırasıyla: 54, 25, 4, 38, 67, 25; Gram negatif bakteriler (n=16) için sırasıyla; 50, 25, 0, 6, 69, 19 olarak saptanmıştır. Toplam direnç oranı ise; imipenem için % 2,5; piperasilin / tazobaktam için %22,5; sefoksitin için % 25, metronidazol için % 25, klindamisin için %52,5 ve penisilin için % 67,5 olarak saptanmıştır.

Doğan ve ark. (2010) tarafından merkezimizde yapılan 22 anaerop bakterinin antibiyotik duyarlılıklarını değerlendirdikleri çalışmada; imipenem, klindamisin, metronidazol, piperasilin/ tazobaktam ve sefoksitin duyarlılık yüzde oranları sırasıyla 100, 82, 91, 100 ve 95 olarak saptanmıştır. Ancak ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada yer alan Gram negatif (n=10)'lerde penisilin direnci yüksek olarak saptanmıştır.

Anaerop bakterilere ait antibiyotik direnç oranları bakterinin türüne ve bölgelere göre değişim göstermektedir. Bunlar içinde *Bacteroides fragilis* grubu (BFG) en virülan ve en çok antibiyotik direncinin gözleendiği anaeroplardır. *B.fragilis* grupta cepA geni varlığında penisilin direncinin % 97'ye ulaştığı bildirilmiştir. Sefoksitin direncinin BFG için Amerika'da %3,7-19 arasında; dünya genelinde ise %9-75 seviyelerine vardığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Pence 2019). BFG arasında klindamisin direnci ise %24-49'a ulaştığı bildirilmektedir. Metronidazol direnci ise dünya geneli %0-2 gibi düşük oranlardadır. Karbapenemlere de direnç %0-2,5 gibi düşük seviyelerde izlenmekte olup; takip edilmelidir (Jeverica ve ark. 2017). Diğer anaerobik Gram negatiflerden *Prevotella* türlerinde ise penisilin direnci %0-68 arasında seyrederken; geneli > %20 olarak tespit edilmiştir (Pence ve ark. 2019).

Bizim çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen 46 anaerop bakterinin 44'üne antibiyotik duyarlılık çalışması gradient test (E test) yöntemi kullanılarak çalışıldı. Çalışmada 14'ü Gram negatif olmak üzere 44 anaerop bakterinin penisilin G, sefoksitin, imipenem, metronidazol, klindamisin, piperasilin/ tazobaktam ve seftolozan tazobaktam için duyarlılıkları değerlendirildi.

Penisilin direnci bakteri türüne ve çalışmanın yapıldığı merkezlere göre değişkenlik göstermekle beraber; genellikle en yüksek direncin görüldüğü antibiyotik grubunu oluşturmaktadır. Bizim çalışmamızda da penisiline duyarlılık %61,4 olarak bulundu. Ancak *B.fragilis* (n=4) için penisilin direncini %100, *Clostridium* spp. (n=9) için % 55.5, *Prevotella* spp. (n=7) için % 28.6 ve Gram pozitif koklardan *Peptoniphilus* spp. (n=4) için %50 oranında saptandı. *Peptostreptococcus* spp.(n=10) ve *Fusobacterium* spp. (n=1) izolatlarında penisilin direnci saptanmadı.

Çalışmamızda sefoksitin, metronidazol, piperasilin-tazobaktam ve klindamisin için antibiyotik direnç oranları sırasıyla %7, % 15.9, % 7, ve % 34.1 olarak saptandı. İmipeneme hiçbir izolatta direnç gözlenmedi. Sefoksitin için saptadığımız düşük direnç oranları *B.fragilis* (n=4) için %50 olarak tespit edildi. Metronidazol direnci saptanan 7 klinik izolatın 5'ini doğal metronidazol doğal direnci olan *Actinomyces* spp. oluşturmaktaydı. Bir *B.fragilis* izolatında ise metronidazol direnci saptanması duyarlılık profillerinin yakından takip edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda en yüksek direnç saptadığımız antibiyotikler penisilin ve klindamisinken; anaerob izolatlarımızda etkinliği en iyi olanları piperasilin-tazobaktam ve imipenem olarak tespit ettik.

Çalışmamızda yeni antibiyotiklerden seftolozan tazobaktamın anaerob bakterilere karşı etkinliği test etmeye çalıştık. Saptadığımız MİK düzeyleri 0,032-12 mg/ arasında değişkenlik göstermekteydi. Seftolozan tazobaktam için en yüksek MİK düzeyleri *B.fragilis* grup izolatlarında saptanırken; en düşük MİK *Clostridium beijerincki* / *butricum* (MİK<sub>50</sub>:0,032 mg/L), *V.parvula* (MİK:0,25 mg/ L) ve *Fusobacterium* spp. (MİK:0,5 mg/L) izolatlarında saptandı. 44 izolat için seftolozan tazobaktamın MİK<sub>50</sub>:2mg/L olarak belirlendi. *B.fragilis* (n=4) izolatları için MİK değerleri (0,064-12 mg/ L) arasında yer alırken; bu tür için MİK<sub>50</sub>:2mg/L olarak tespit ettik.

Armstrong ve ark.(2016)'nın seftolozan-tazobaktamın anaerob bakteriler üzerine etkinliğini araştırdıkları çalışmada MİK değerlerinin *B.fragilis* grup için değişkenlik gösterdiğini; *Bacteroides thetaiotaomicron* ve *Bacteroides vulgatus* için MİK<sub>90</sub>:64mg/L olarak; *Bacteroides fragilis* ve *Bacteroides stercoris* için MİK<sub>90</sub>:2mg/L olarak tespit edilmiştir.

Seftolozan-tazobaktamın anaerob bakteriler üzerindeki etkinliğinin saptanabilmesi için daha çok bakteri türünü ve sayısını içeren çalışmalara gereksinim vardır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Anaeroplara; enfeksiyon etiolojisinde önemli bir paya sahip olmasına karşın; anaerop bakteriyoloji çalışmaları zahmetli, deneyim gerektiren ve maliyetli işlemlerdir. Ancak anaerop bakteriler arasında artan antibiyotik direnç oranları ve bu bakterilerin ciddi enfeksiyona sebep olmaları sebebiyle duyarlılık çalışmalarına ihtiyaç artmaktadır. Klinik örneklerden anaerop bakteri izolasyon başarısını etkileyen; örneklerin alımı, numunenin doğru şekilde transportu gibi pre-analitik sürecin yönetiminde klinik-laboratuvar iş birliği şarttır. Laboratuvar akışında besiyerinin günlük ve taze olması, işlemler sırasında anaerop ortamın sağlanması, doğru identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık çalışmalarında standardizasyon gibi hususlarda oldukça önemlidir. Çalışmamızda iki ticari yarı otomatize identifikasyon yöntemi kıyaslanmış olup; literatürde bu konuda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Sistemler arası uyumsuzlukların aydınlatılması için daha fazla sayı ve bakteri türünü içeren geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anaerop bakteriler için antibiyotik duyarlılık çalışmaları rutin olarak önerilmemekle birlikte; direnç profili yüksek olma ihtimali olan izolatların uygulanması önerilmektedir. Çalışmamızda klindamisine karşı görülen yüksek direnç oranları sebebiyle ampirik tedavi için kullanılmasını önermemekle birlikte, ihtiyaç halinde antibiyotik duyarlılık sonucuna başvurarak kullanılmasını tavsiye etmekteyiz. Çalışmamızda yeni antibiyotiklerden seftolozan tazobaktamın anaerop bakteriler üzerindeki etkinliğini değerlendirmeye çalıştık. İlgili antibiyotik için MİK değerinin bakteri türleri arasında oldukça değişkenlik gösterdiğini tespit ettik. Ancak anaeroplara karşı bu antibiyotiğin etkisini kavrayabilmemiz için daha çok bakteri türü ve sayısını içeren geniş çaplı çalışmalara gereksinim vardır.

Rutin olarak anaerop etkenler için antibiyotik duyarlılık testleri gerekli görülmesi de; klinik izolatlar saklanarak belirli aralıklarla duyarlılık çalışmaları yapılmalı ve direnç profilleri yakından takip edilmelidir. Bu sayede elde edilen verilerin akılcı antibiyotik kullanım politikalarının uygulanmasında faydalı olacağı kanatını taşımaktayız.

## 7. KAYNAKLAR

- Aldridge KE**, Ashcraft D, O'Brien M and Sanders CV. Bacteremia due to *Bacteroides fragilis* group: distribution of species,  $\beta$ -lactamase production, and antimicrobial susceptibility patterns. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003; 47(1), p: 148-153.
- Akgül Ö**. Gram Pozitif Anaerop Kokların Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 2018 (Tez Danışmanı: Prof.Dr. Nurver Ülger Toprak).
- Akyüz S**, Parlak M, Güdücüoğlu H.Yoğun Bakım Hastalarından İzole Edilen Çoklu Antibiyotik Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Seftolozan-Tazobaktamın Çeşitli Antibiyotik Kombinasyonları ile İn Vitro Etkinliğinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2020; 54(1),p: 154-162.
- Aldridge KE**, Ashcraft D, Cambre K, Pierson C L, Jenkins S G and Rosenblatt JE. Multicenter Survey of the Changing In Vitro Antimicrobial Susceptibilities of Clinical Isolates of *Bacteroides fragilis* Group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* Species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001,;45(4), p: 1238-1243.
- Armstrong ES**, Farrell D J, Palchak M, Steenbergen JN. In vitro activity of ceftolozane-tazobactam against anaerobic organisms identified during the ASPECT-cIAI study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016; 60(1), p:666-668.
- Aydın M**, Anaerop bakteriler ve anaerobizm, Ed. Mısırlıgil, Cengiz, Aydın. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji, 20044,Güneş Yayınevi, Ankara, p. 569-576/ 91-110.
- Babinchak T**, Ellis-Grosse E, Dartois N, Rose GM, Loh E. The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of complicated intraabdominal infections: analysis of pooled clinical trial data. *Clin. Infect. Dis*.2005. 41(5):S354 –S367
- Bandoh K**, Watanabe K, Muto Y, Tanaka Y, Kato N, Ueno K. Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 1992;45, p:542–547.
- Bartlett JG**. Clostridium tetani. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, editors. *Infectious diseases*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1992:1580-3.
- Begum S**, Roy S and Yusuf A. Anaerobic bacteria: infection and management. *IOSR Journal of Dental Medical Sciences*.2015; 14(12), 69-72.
- Bennion RS**, Thompson JE, Baron E J and Finegold, S. M. Gangrenous and perforated appendicitis with peritonitis: treatment and bacteriology. *Clinical therapeutics*,1990, 12, 31-44.
- Bilgehan H**. Anaerop bakteriler. *Klinik Mikrobiyoloji Tanı*.2009, 5.Baskı, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir, p:135-158.
- Bilgehan H**. Mikroorganizmaların beslenmesi ve üretilmesi. *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*. 2002, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınevi, İzmir. p: 71-102.
- Bilgehan H**. Mikroorganizmaların metabolizması ve enzimleri. *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*.2002, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir. p: 103-19.
- Birengel S**. Klostridial enfeksiyonlar (Klinik Özellikler). X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 15-19 Ekim 2001, Adana / Türkiye.
- Blairon L**, Maza ML, Wybo I, Pierard D, Dediste A, Vanderberg O. Vitek 2 ANC card versus BBL crystal anaerobe and RapID ANA II for identification of clinical anaerobic bacteria. *Anaerobe* 2010;16, p:355-61.
- Blondeau JM**, Sanche SE. Quinupristin/dalfopristin. *Expert Opin Pharmacother*. 2002;3,p:1341-6.
- Boyanova L**, Kolarov R, Gergova G, Deliverska E, Madjarov J, Marinov M, et al. Anaerobic bacteria in 118 patients with deepspace head and neck infections from the University

Hospital of Maxillofacial Surgery, Sofia, Bulgaria. *Journal of Medical Microbiology* 2006; 55, p: 1285–9.

- Brook I** and Long SS. Anaerobic bacteria: classification, normal flora, and clinical concepts. In *Principles and practice of pediatric infectious diseases*, Elsevier, 2018; pp. 987-995.
- Brook I**, Wexler HM and Goldstein EJ. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013; 26(3), p: 526-546.
- Brook I**. Treatment of anaerobic infections in children with metronidazole. *Dev. Pharmacol.* 1983;6, p:187–198.
- Brook I**. Antimicrobial treatment of anaerobic infections. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2011; 12(11), p: 1691-1707.
- Brook I**. Antimicrobials therapy of anaerobic infections. *Journal of Chemotherapy*. 2016b; 28 (3), p: 143-150.
- Brook I**. Spectrum and treatment of anaerobic infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2016a; 22 (1), p: 1-13.
- Brook I**. Treatment of anaerobic infection. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2007; 5(6), p: 991-1006.
- Brook I**. Bacteriology of acute and chronic frontal sinusitis. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2002; 128(5), p: 583-585.
- Bryant AE**, Chen RY, Nagata Y, Wang Y, Lee CH, Finegold S, Guth PH, Stevens DL. Clostridial Gas Gangrene. II. Phospholipase C—Induced Activation of Platelet gpIIb/IIIa Mediates Vascular Occlusion and Myonecrosis in Clostridium perfringens Gas Gangrene. *The Journal of infectious diseases*, 2000;182(3), p: 808-815.
- Busch DF**, Kureshi LA, Sutter VL, Finegold SM. Susceptibility of respiratory tract anaerobes to orally administered penicillins and cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976(10), p:713–720.
- Bush K**. Beta-lactamases of increasing clinical importance. *Curr.Pharm. Des.* 1999; 5, p:839–845.
- Citron DM**, Hecht DW. Susceptibility test methods: anaerobic Bacteria. In Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (ed), *Manual of clinical microbiology*, 2011, 10th ed. ASM Press, Washington, DC. p:1204–1214
- Claros M**, Citron DM, Goldstein EJ, Merriam CV and Tyrrell, K. L. Differences in distribution and antimicrobial susceptibility of anaerobes isolated from complicated intra-abdominal infections versus diabetic foot infections. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013; 76(4), p: 546-548.
- Cobo F**, Rodríguez-Granger J, Pérez-Zapata I, Sampedro A, Aliaga L, Navarro-Mari JM. Antimicrobial susceptibility and clinical findings of significant anaerobic bacteria in southern Spain. *Anaerobe* .2019;59, p: 49-53.
- Cooley L** and Teng J. "Anaerobic resistance: should we be worried?." *Current Opinion in Infectious Diseases* 2019; 32(6), p: 523-530.
- Demir C**. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Gram negatif çomakların tiplendirilmesi ve antibiyotik direnç profillerinin E test yöntemi ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar, 2015
- Doğan M**. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen anaerob bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi (Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi), 2008, Konya
- Dowell VR**. Determination of cultural and biochemical characteristics. In: *Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology: CDC Laboratory Manual*, 1974; p7-41.
- Drasar DR** and Hill MJ. *Human intestinal flora*. Academic press, London. 1975.
- Durmaz B**, Anaerob bakterilerin identifikasyonunda sorunlar. 2003 XI Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Cilt:16, Özel sayı: 1, İstanbul, MART 2003

- Eitel Z**, Sóki J, Urbá, E and Nagy E. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. *Anaerobe*. 2013; 21, p:43-49.
- Engelkirk PG**, Engelkirk-Duben J, Dowell VR. In: Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology. Ed: Stuart Hoffman. 1992, Star Publishing Company. California. p: 1-462
- Eschenbach DA**. Bacterial vaginosis and anaerobes in obstetric-gynecologic infection. *Clin. Infect. Dis.* 1993; 16, pp:282-287.
- Finch RG**. Antibacterial activity of quinupristin/dalfopristin. *Ration Clin Use Drugs*. 1996;51(1), p: 31-7.
- Finegold SM**. Changes in taxonomy, anaerobes associated with humans, 2001-2004. *Anaerobe*, 2004. 10(6): p. 309-312
- Finegold SM**, Shutter VL and Mathiesen GE. Normal indigenous intestinal flora. In Hentges DJ (ed.), *Human intestinal microflora in health and disease*. Academic Press, New York. 1983: pp 3-31.
- Finegold SM**. A century of anaerobes: a look backward and a call to arms. *Clinical infectious*; 16(4), p: 453-457.
- Finegold SM**. Anaerobic bacteria: General concepts. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R (Eds). *Principles and Practice of Infection Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1995:2156-73
- Forbes BA**, Sahm DF, Weissfeld AS, *Anaerobic Bacteriology*, Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2007, p:455-477.
- Gajdács M**, Spengler G, and Urbán E. "Identification and antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: Rubik's cube of clinical microbiology?" *Antibiotics*. 2017; 6(4), 25
- Gholizadeh P**, Eslami H and Kafil HS. Carcinogenesis mechanisms of *Fusobacterium nucleatum*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2017; 89, pp:918-925.
- Goldstein EJ** and Citron DM. Resistance trends in antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria, part I, *Clinical microbiology newsletter*, 2011; 33(1), p: 1-8.
- Goldstein EJ**, Citron DM, Vaidya SA, Warren YA, Tyrrell K L, Merriam CV and Fernandez H. In vitro activity of 11 antibiotics against 74 anaerobes isolated from pediatric intra-abdominal infections. *Anaerobe*. 2006; 12(2), p: 63-66.
- Goldstein EJC**, Citron DM, Merriam CV, Abramson MA. Infections after elective colorectal surgery: bacteriological analysis of failures in a randomized trial of cefotetan vs. ertapenem prophylaxis. *Surg Infect*. 2009;10(1), p:111-8.
- Goldstein EJC**, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT. Comparative in vitro susceptibilities of 396 unusual anaerobic strains to tigecycline and eight other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006; 50, p:3507-3513.
- Gürler N**, Anaerop infeksiyonlar ve laboratuvar tanısı. Anaerop bakteri infeksiyonları. Eds: Ulusoy S, Leblebicioğlu H. 2005. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
- Gürler N**. Anaerop bakteri infeksiyonlarını laboratuvar tanısı. X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 15-19 Ekim 2001, Adana / Türkiye.
- Hall G**, Mangels J. Incubation Techniques for Anaerobic Bacteriology Specimens. In Leber A (ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Fourth Edition, 2016. ASM Press, Washington, p: 4.4.1-4.4.4
- Han YW**. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Current opinion in microbiology*. 2015; 23, p: 141-147.
- Harvey RA**, Cornelissen CN, Fisher BD. Lippincott Mikrobiyoloji: Şekillerle Açıklamalı Derleme Ders Kitapları. Çeviri Ed: Anđ Ö. 2018, Nobel tıp kitapçevleri, İstanbul, p:149-161.
- Hecht DW**, Osmolski JR, O'Keefe JP. Variation in the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates from six Chicago hospitals. *Clin Infect Dis* 1993;16 (4), p:357-S360

- Hellinger WC**, Brewer NS. Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. *Mayo Clin Proc.* 1999; 74, p:420–434.
- Hentges DJ**. Anaerobes as normal flora. In: *Anaerobic infections in humans*. Eds: Finegold SM, George WL. 2012, Elsevier, San Diego, p: 37-53.
- Hentges DJ**. The anaerobic microflora of the human body. *Clin. Infect. Dis.* 1993. 16( 4), p:175–180.
- Hetch DW**. Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe.* 2006;12, p: 115-121.
- Hifumi T**, Koido Y, Takahashi M, Yamamoto A. Antitoxin treatment for liver abscess caused by *Clostridium perfringens*. *Clinical and molecular hepatology.* 2013;19(1), p:97-99.
- Hifumi T**, Takahashi M, Morokuma K, Haraguchi Y, Kato H, Koido Y et al. Do you know the *Clostridium perfringens* antitoxin? *J Jpn Soc intensive Care Med.* 2010;17, p:287–289.
- Ho PL**, Yau CY, Ho LY, Chen JHK, Lai ELY, Lo SWU et al. Rapid detection of *cfiA* metallo-beta-lactamase-producing *Bacteroides fragilis* by the combination of MALDI-TOF MS and CarbaNP. *J Clin Pathol* 2017;70, p:868-73.
- Hungate R E**. Methods in microbiology. A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes, Academic Press, New York, 1969, pp: 117-132.
- Isenberg HD**, Anaerobic Bacteriology, Culture media for anaerobes (Section 4)., *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2004, 2th Edition, Washington DC.
- Jeverica S**, Kolenc U, Mueller-Premru M, Papst L. Evaluation of the routine antimicrobial susceptibility testing results of clinically significant anaerobic bacteria in a Slovenian tertiary-care hospital in 2015. *Anaerobe.* 2017;47, p:64-9.
- Jousimies-Somer HR**, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, and Finegold MS. In *Wadsworth-Ktl Anaerobic Bacteriology Manual*. Belmont, California: Star Publishing, 2002; p:10-220.
- Kato N**, Yamazoe K, Han C, Ohtsubo E. New insertion sequences in upstream region of *cfiA* in imipenem-resistant *Bacteroides fragilis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47, p:979–985.
- Kaya S**, Klinik örneklerden izole edilen anaerob bakterilerin laboratuvar tanisi ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gata Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı, 2012, Ankara.
- Keating GM**, Perry CM. Ertapenem: a review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs.* 2005; 65, p:2151–2178.
- Kempf I**, Kerouanton A, Bougeard S, Nagard B, Rose V, Mourand G et al. *Campylobacter coli* in organic and conventional pig production in France and Sweden: prevalence and antimicrobial resistance. *Frontiers in microbiology.* 2017; 8, p:955-57.
- Kesli R**. Çeşitli klinik örneklerden izole edilerek tanımlanan anaerob bakteriler ve E-test yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi (Uzmanlık Tezi). Erzurum: A.Ü. Tıp Fakültesi, 2001.
- Kıyan M**. Anaerob bakteriler. In: Ustaçelebi S (ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 611-22.
- Kiremitçi A**, Türkkan AA, Akgün Y, Durmaz G, Kaşifoğlu N. Klinik örneklerden anaerob bakterilerin soyutlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, *Ankem Derg* 2008; 22: 132-44.
- Klainer AS**. Clindamycin. *Med. Clin. North Am.* 1987;71, p:1169–1175.
- Koru O** and Ozyurt M. Determination of antimicrobial susceptibilities of clinically isolated anaerobic bacteria by E-test, ATB-ANA and agar dilution. *Anaerobe.* 2008, 14(3), p:161-165.

- Kozlov A**, Bean L, Hill EV, Zhao L, Li E and Wang GP. Molecular identification of bacteria in intra-abdominal abscesses using deep sequencing. In Open forum infectious diseases. Oxford University Press, 2018; 5 (2), p:25.
- Kumar N**, Browne HP, Viciani E, Forster SC, Clare S, Harcourt K ,Pirmohamed M et al. Adaptation of host transmission cycle during *Clostridium difficile* speciation. Nature genetics. 2019;51(9), p: 1315-1320.
- Kuriyama T**, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.2000 ; 90, p:600–608.
- Lee EH**, Degener JE, Welling GW, Veloo AC. Evaluation of the new Vitek 2 ANC card for identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol. 2011;49, p:1745-9.
- Levinson W**, Murray P, Başlıca patojenlere genel bakış ve anaerob bakterilere giriş. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji.2018, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara , p:301-320.
- Liu CY**, Huang YT, Liao CH, Yen LC, Lin HY, Hsueh PR. Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems. Antimicrob. Agents Chemother, 2008; 52, p:3161–3168.
- Liu Y**, Ko EY, Wong KK et al. Endometrial microbiota in infertile women with and without chronic endometritis as diagnosed using a quantitative and reference range-based method. Fertil Steril. 2019;112(4), p:707-717.
- Lofmark S**, Edlund C, Nord CE. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. Clin Infect Dis 2010;50(1), p:16-23.
- Mangels JI**, Isenberg HD, Anaerobic Bacteriology. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Washington DC, 2004, p.p.4.11-4.12.6.
- McCord JM**, Keele BB and Fridovich I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1971; 68 (5), p: 1024-1027.
- Mikamo H**, Arakawa S, Fujiwara M, Funada H, Inamatsu T, Iwata S and et al. Japanese Society of Chemotherapy Committee on guidelines for treatment of anaerobic infections, & Japanese Association for Anaerobic Infection Research. 2. Appendix: Anaerobes constituting the indigenous flora. Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy. 2011; 17, 159.
- Montero VE**. Identification of anaerobes in hospitals of chile, Elsevier, Anaerobe, Volume: 5, 1999, p.105-108.
- Moore WEC** and Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. Appl Microbiol.1974; 27, p:961–979.
- Munson E**, and Carroll KC. What's in a name? New bacterial species and changes to taxonomic status from 2012 through 2015. Journal of clinical microbiology.2017; 55(1), pp: 24-42.
- Murray PR**, Rosenthal KS and Pfaller MA. Anaerobik, Sporsuz, Gram –Pozitif Bakteriler. Tıbbi Mikrobiyoloji. Elsevier Health Sciences.7.baskı . 2016, pp:339-344.
- Murray PR**, Rosenthal KS and Pfaller MA. *Clostridium*.Tıbbi Mikrobiyoloji. Elsevier Health Sciences.7.baskı .2016, pp:327-339.
- Nagy E**, Boyanova L, Justesen US and et al. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories. Clinical Microbiology and Infection. 2018; 24(11), 1139-1148.
- Nagy E**, Urban E, Nord CE. ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. Clin Microbiol Infect 2011; 17, p:371–379.
- Nagy E**. Anaerobic infections. Drugs. 2010;70 (7), p: 841-858.

- Noor A** and Khetarpal S. Anaerobic infections.2020, StatPearls publishing.
- Nord CE**, Hedberg M. Resistance to b-lactam antibiotics in anaerobic bacteria. *Rev Infect Dis* 1990;12, p:231–234.
- Ozinel MA**, Diyabetik ayak infeksiyonları: Etkenler ve klinik mikrobiyolojik tanı. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AB Dalı, İzmir, *Klinik Dergisi*, 2003: p. 148-149.
- Park GC**, Jang SJ, Lee MJ, Kook JK, Kim MJ, Kim YS and Moon DS. Comparison of the Vitek 2, API 20A, and 16s rRNA gene sequencing for the identification of anaerobic Bacteria. *Annals of Clinical Microbiology*.2015, 18(1), 20-26
- Peeters B**, Magerman K, Waumans L and Cartuyvels RLaboratory survey and literature review of anaerobic bacteriology: foundations of a clinically orientated and evidence-based workup for anaerobic cultures. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2016; 86(1), p: 15-22.
- Pence MA**. Antimicrobial Resistance in Clinically Important Anaerobes. *Clinical microbiology newsletter*.2019; 41(1), p: 1-7.
- Piriz S**, Vadillo S, Quesada A, Criado J, Cerrato R, Ayala J. Relationship between penicillin-binding protein patterns and  $\beta$ lactamases in clinical isolates of *Bacteroides fragilis* with different susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Med Microbiol* 2004;53, p:213–221.
- Podglajen I**, Breuil J, Collatz E. Insertion of a novel DNasequences, IS1186, upsternam of the silent carbapenemase gene *cfiA*, promotes expression of carbapenem resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. *Mol Microbiol* 1994;12,p:105–114.
- Procop GW**, Church DL, Hall GS, Janda WM, et and al, *The Anaerobic Bacteria*. seventh edition ed. *Koneman's Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2017.
- Rasmussen BA**, Bush K, Tally FP. Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clin Infect Dis* 1997;24(1), p:110–120.
- Rennie RP**, Brosnikoff C, Turnbull L, Reller LB, Mirrett S, Janda W and Krilcich A. Multicenter evaluation of the Vitek 2 anaerobe and *Corynebacterium* identification card. *Journal of clinical microbiology*.2008, 46(8), p:2646-2651.
- Rennie RP**, Turnbull L, Brosnikoff C and Cloke J. First comprehensive evaluation of the MIC evaluator device compared to Etest and CLSI reference dilution methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical strains of anaerobes and other fastidious bacterial species. *Journal of clinical microbiology*.2012; 50(4), p:1153-1157.
- Rodríguez-Cavallini E**, Vargas P, Rodríguez C, Quesada-Gómez C and GamboaCoronado MM. Phenotypic identification of over 1000 isolates of anaerobic bacteria recovered between 1999 and 2008 in a major Costa Rican hospital. *Clinical microbiology and infection*.2011, 17(7), p:1043-1047.
- Rosenblatt JE**. Can we afford to do anaerobic cultures and identification? A positive point of view. *Clinical Infectious Diseases*, 1997: 25, p:127-31
- Scalfaro C**, Auricchio B, De Medici D and Anniballi F. Foodborne botulism: an evolving public health challenge. *Infectious Diseases*.2019; 51(2), 97-101.
- Schatzman SS** and Culotta V C. Chemical warfare at the microorganismal level: a closer look at the superoxide dismutase enzymes of pathogens. *ACS infectious diseases*. 2018; 4(6), 893-903.
- Schuetz AN**. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clinical infectious diseases*.2014; 59(5), 698-705.
- Sherwood JE**, Fraser S, Citron DM, Wexler H, Blakely G, Jobling K, Patrick S. Multi-drug resistant *Bacteroides fragilis* recovered from blood and severe leg wounds caused by an improvised explosive device (IED) in Afghanistan. *Anaerobe*, 2011,17, p:152–155.
- Snydman DR**, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Goldstein EJC, Harrell L, Jenkins S, Newton D, Pierson C, .Rosenblatt J, Venezia R, Gorbach SL, Queenan AM, Hecht DW.

Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006–2009. *Anaerobe* 2011; 17, p:147–151.

- Snydman DR**, McDermott LA, Jacobus NV. Activity of ceftolozanetazobactam against a broad spectrum of recent clinical anaerobic isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58, p:1218–1223
- Solomkin JS**, Mazuski JE, Bradley JS, Rodvold KA, Goldstein EJ, Baron EJ, O'Neill PJ, Chow AW, Dellinger EP, Eachempati SR, Gorbach S, Hilfiker M, May AK, Nathens AB, Sawyer RG, Bartlett JG. Diagnosis and management of complicated intraabdominal infections in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2010;50, p:133–164.
- Song Y** and Finegold SM. *Peptostreptococcus*, *Finegoldia*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Veillonella*, and other anaerobic cocci. *Manual of Clinical Microbiology.* 2011, 10th Edition, American Society of Microbiology, p: 803-816.
- Song Y.** PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe* 2005;11, p: 79–91.
- Stojanović RM** and de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews*, 2014; 38(5), p: 996-1047.
- Strohl WA**, Rouse H, Fisher BD. Bacterial structure, growth, and metabolism. In: Harvey RA, Champe PA eds. *Lippincott's Microbiology.* Philadelphia: Williams and Wilkins 2001: p:101-110.
- Şengöz G**, Yaşar K, Berzeg D, Yıldırım F, Şengöz A, Elmi Ş, Durdu Y, Nazlıcan Ö. Klinik örneklerden izole edilen anaerob bakteriler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2005; 35, p:107-13.
- Tally FP**, Goldin BR, Jacobus NV and Gorbach SL. Superoxide dismutase in anaerobic bacteria of clinical significance. *Infection and immunity*, 1997, 16(1), p:20-25
- Tan ZL**, Nagaraja TG and Chengappa MM. *Fusobacterium necrophorum* infections: virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. *Veterinary research communications*, 1996; 20(2), p: 113-140.
- Torun M**, Anaerob bakteri infeksiyonları: Kültürde sorunlar. XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, İstanbul, p. 25-28, 2003.
- Torun M.** Anaerob bakterilerde direnç mekanizmaları. 4. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı, İstanbul, 17–19 Mayıs 1999 s.105–118.
- Tünger A**, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. *Asya Mikrobiyoloji*, Asya Kitabevi, İzmir. 2005; p.60-70
- Türkan AA**, Klinik örneklerden soyutlanan anaerob bakterilerin tanımlanması ve E-test yöntemi ile Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Eskişehir, 2008.
- Uysal EB**, Çelik C, Alan Ç, Kaya H, Gözel MG, Bakırcı M. Klinik örneklerden izole edilen anaerobik bakteriler: Yedi yıllık değerlendirme. *Cumhuriyet Medical Journal*, 2014, 36(3), p.:327-331.
- Uzunkaya Ö.** *Bacteroides fragilis* grup bakterilerde karbapenem ve 5- nitroimidazol direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle karşılaştırılması. Uzmanlık tezi, Marmara Üniversitesi, 2015, İstanbul.
- Ülger TN**, Sayın E, Dane F, Söyletir F (2013). The first metronidazole-resistant *Bacteroides* species isolated at Marmara University Hospital: *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Mikrobiyoloji bülteni*. 2013, 47(4), 717-721.
- Ülger TN**, Sayın E, Dane F, Söyletir F. Enterotoksin geni pozitif ve negatif *Bacteroides fragilis* izolatlarının antibiyotiklere direnç durumlarının karşılaştırılması. *Mikrobiyol bült.* , 2005: p. 39: 145-152.
- Veloo AC**, Tokman HB, Jean-Pierre H, Dumont Y, Jeverica S, Lienhard R et al. Antimicrobial susceptibility profiles of anaerobic bacteria, isolated from human clinical specimens, within different European and surrounding countries. A joint ESGAI study. *Anaerobe*. 2020; 61, 102111.

- Wang Y**, Chen XF, Xie XL, Xiao M, Yang Y, Zhang G and Tsui C. Evaluation of VITEK MS, Clin-ToF-II MS, Autof MS 1000 and VITEK 2 ANC card for identification of *Bacteroides fragilis* group isolates and antimicrobial susceptibilities of these isolates in a Chinese university hospital. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*.2019, 52(3), 456-464.
- Wayne PA**. CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard-Eighth Edition. CLSI Document M11-A8. Clinical Laboratory Standards Institute; 2012.
- Wexler HM**. *Bacteroides*—the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.*2007. 20: 593–621.
- Winn WC**, Koneman EW, Allen SD, Procop GW, Janda WM, Schreckenberger PC, et al. The Anaerobic Bacteria. *Konemans Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2006, p: 877-944.

