



**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BACTEROIDES FRAGILIS GRUBU BAKTERİLERDE KARBAPENEM  
VE 5-NİTROİMİDAZOL DİRENCİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK  
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**DR. ÖZLEM UZUNKAYA  
UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL 2009**



**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BACTEROIDES FRAGILIS GRUBU BAKTERİLERDE KARBAPENEM  
VE 5-NİTROİMİDAZOL DİRENCİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK  
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**DR. ÖZLEM UZUNKAYA  
UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: DOÇ.DR. NURVER ÜLGER**

**İSTANBUL 2009**

## ÖNSÖZ

Asistanlığım süresince bana yol gösteren, bilgilendiren, deneyimlerini aktaran, tezle ilgili çalışmalarımda sabırla yönlendiren başta Doç. Dr. Nurver Ülger olmak üzere uzmanlık eğitimim boyunca emeği geçen tüm değerli hocalarıma, karşılıklı uyum, anlayış ve yardımlaşma içinde aynı çatı altında çalıştığımız asistan arkadaşlarıma, çalışmalarım sırasında bana daima destek olan ailem ve eşime

Teşekkür ederim.

Dr. Özlem UZUNKAYA

## İÇİNDEKİLER:

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET (Abstract).....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. <i>Bacteroides fragilis</i> grubu Bakteriler (BFG).....	4
2.2.1. <i>Bacteroides fragilis</i> grubu Bakteri Enfeksiyonlarının Patogenezi.....	6
2.2.1.1. Konağa ait faktörler.....	6
2.2.1.2 Virülans Faktörleri.....	6
2.3. <i>Bacteroides fragilis</i> grubu Bakterilerin Neden Olduğu Enfeksiyonlar.....	8
2.4. <i>Bacteroides fragilis</i> grubu Bakterileri Enfeksiyonların Laboratuvar Tanısı...9	
2.5. Antimikrobiyal Tedavi.....	11
2.5.1. <i>Bacteroides fragilis</i> grubu Bakterilerde Antimikrobiyallere Karşı Direnç Mekanizmaları.....	11
2.5.1.1. Beta-laktam Antimikrobiyallere Direnç.....	11
2.5.1.2. 5- Nitroimidazole Direnç.....	13
2.5.1.3. Diğer Antimikrobiyallere Karşı Direnç .....	14
2.6.2. <i>Bacteroides fragilis</i> grubu Bakteriler ve IS elementleri.....	14
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	
3.1. Gereçler.....	16
3.1.1. Standart kökenler.....	16
3.1.2. Besiyerleri.....	16
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler, antibiyotik diskleri, kitler.....	18
3.1.4. Kullanılan PZR malzemeleri.....	21
3.1.5. Kullanılan araçlar, aygıtlar.....	21

3.2. Yöntemler.....	22
3.2.1. <i>Bacteroides fragilis</i> grubu Bakterilerin Tanımlanması.....	23
3.2.2. İmipenem, meropenem ve 5-nitroimidazol duyarlılığının saptanması (Agarda dilüsyon yöntemi) .....	24
3.2.3. Moleküler Yöntemler.....	25
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>27</b>
<b>5.TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....</b>	<b>42</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>49</b>

## ÖZET

### ***Bacteroides fragilis* Grubu Bakterilerde Karbapenem ve 5-Nitroimidazol Direncinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması**

Anaerobik enfeksiyonlardan en sık izole edilen *Bacteroides fragilis* grubu (BFG) bakteriler, antimikrobiallere diğer anaeroblara göre daha fazla dirençlidirler. Karbapenemler ve nitroimidazol türevleri, *Bacteroides* türleri üzerinde en etkili antibiyotikler olmakla beraber, dirençli kökenler bildirilmiştir. Karbapenem ve metronidazol direncinden sorumlu olan genler sırasıyla *cfiA* ve *nim* genleridir. Direnç genleri, hemen önlerinde yer alan IS1169, IS1170, IS1186, IS1187 ve IS4351 gibi "Insertion Sequences" (IS) elementleri ile uyarılabilmektedir. Bu çalışmada, BFG bakterilerinin karbapenem ve metronidazole duyarlılık durumları ile *cfiA*, *nim* genleri ve ilişkili IS elementleri araştırılmıştır. Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı stoklarında bulunan, klinik örneklerden izole edilmiş BFG bakteriler çalışmaya alınmıştır. Bakteriler, klasik yöntemlerle ve ticari olarak bulunan yarı otomatize sistemlerle tür düzeyinde tanımlanmış, CLSI'nın (M11-A7) önerdiği agarda dilüsyon yöntemi ile imipenem, meropenem ve 5-nitroimidazol duyarlılıkları araştırılmıştır. *cfiA* ve *nim* direnç genleri ile IS elementlerinin varlığı PZR ile araştırılmıştır. Çalışmaya alınan toplam 66 kökenin 48'i *Bacteroides fragilis*, 10'u *Bacteroides thetaiotaomicron*, 6'sı *Bacteroides uniformis/ovatus*, 1'i *Bacteroides distasonis* ve 1'i *Bacteroides vulgatus* olarak tanımlanmıştır. Metronidazole dirençli köken bulunmamıştır. *Bacteroides fragilis* dışındaki BFG bakterilerde karbapenemlere karşı direnç

saptanmazken; *Bacteroides fragilis* kökenlerinin %8'i imipeneme, %10'u ise meropeneme dirençli bulunmuştur. Hiçbir kökende metronidazol direnç genine rastlanmamıştır. *cfiA* geni sadece *B.fragilis* türünde 18 kökende tespit edilmiştir. IS1187 elementi, 10'u *B.fragilis* olmak üzere toplam 21 kökende saptanmıştır. *cfiA* ile IS1187'nin beraber olduğu 5 kökenin 4'ü karbapenemlere dirençli bulunmuştur. Çalışmamız ile elde ettiğimiz bulgular, henüz anaerob bakterilerdeki antimikrobiyal dirence ait moleküler araştırmaların yapılmadığı ülkemizde, BFG bakterilerinin direnç genleri hakkında bir veri tabanı oluşturacaktır. Şimdilik metronidazol direnci için bir risk yokmuş gibi gözükmektedir. *Bacteroides fragilis* dışındaki BFG bakterileri karbapeneme duyarlı bulunmakla beraber *Bacteroides fragilis* kökenlerinde yaklaşık %10 oranında karbapenem direnci bulunmaktadır. *Bacteroides fragilis* kökenlerinde *cfiA* geni ile IS elementinin fazla bulunması nedeniyle, dirençli köken gelişimi açısından *Bacteroides fragilis* grubu bakterilerin yakın takibi önem kazanmaktadır.

## SUMMARY

### Investigation of Carbapenem and 5-Nitroimidazole Resistance among *Bacteroides fragilis* Group Bacteria by Phenotypic and Genotypic Methods

*Bacteroides fragilis* group (BFG) is the most commonly encountered bacteria from anaerobic infections and more resistant to antimicrobial agents than the other anaerobes. Although carbapenems and nitroimidazoles are the most effective antibiotics against *Bacteroides* spp., resistant isolates have been reported. The genes, which are responsible for the resistance against carbapenems and metronidazole, are *cfiA* and *nim*, respectively. Resistance genes should be activated by upstream "Insertion Sequences" (IS) elements such as IS1169, IS1170, IS1186, IS1187 and IS4351. In this study the *cfiA*, *nim* genes and related IS elements and susceptibility profiles of BFG against carbapenems and metronidazole have been investigated. The study was performed in the strains isolated from clinical specimens at Marmara University Hospital. The strains were identified by using both conventional test and the commercially available biochemical kits and antimicrobial susceptibilities against imipenem, meropenem and 5-nitroimidazole were performed according to recommendations of CLSI (M11-A7) agar dilution methods. The resistance genes *cfiA* and *nim*, IS elements were determined by PCR. Among 66 BFG tested strains, 48 were identified as *Bacteroides fragilis*, 10 *Bacteroides thetaiotaomicron*, 6 *Bacteroides uniformis/ovatus*, 1 *Bacteroides distasonis* and 1 *Bacteroides vulgatus*. There were no resistant strains against metronidazole. Although all non-*B.fragilis* strains were susceptible to carbapenems, in *Bacteroides fragilis* imipenem and meropenem resistance rates were 8% and 10 % respectively. Metronidazole resistance genes were not detected in any strains. *cfiA* gene (n:18) only has been determined among *Bacteroides fragilis* strains.

Total of 21 IS1187 positive BFG bacteria have been detected and 10 of them were *Bacteroides fragilis*. Four of the five *Bacteroides fragilis* strains which have possessed both *cfiA* and IS1187 elements together were phenotypically resistant to carbapenems. Our findings have provided a database about resistance genes of pathogenic BFG in Turkey, where molecular investigation of antimicrobial resistance of anaerobes has not been performed so far. For the time being the present, it looks like that there is no risk for metronidazole resistance. Although non- *Bacteroides fragilis* strains are susceptible to carbapenems, nearly 10% of *Bacteroides fragilis* strains are resistant to them. Because of possessing *cfiA* gene and IS elements is more common among *Bacteroides fragilis*, it seems to be important to monitor *Bacteroides fragilis* for emergence of resistant strains.

## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

**BFG:** *Bacteroides fragilis* grubu

**IS:** Insertion Sequences

**PNL:** Polimorf nüveli lökosit

**LPS:** Lipopolisakkarit

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**FDA:** Food and Drug Administration

**E-test:** Epsilon Test

**PBP:** Penisilin bağlayıcı protein

**OMP:** Outer membran protein ( Dış membran proteini)

**EDTA:** Ethylendiaminetetraasetic acid

**MİK:** Minimal İnhibitör Konsantrasyon

**CAT:** Kloramfenikol asetil transferaz

**DNA:** Deoksiribonukleik asit

**PZR:** Polimeraz zincir reaksiyonu

**IPM:** İmipenem

**MEM:** Meropenem

## RESİM DİZİNİ

**Resim 1.** Gram yöntemiyle boyanmış *Bacteroides fragilis*

**Resim 2.** *Bacteroides fragilis*'in %5 koyun kanlı agardaki görüntüsü

**Resim 3.** *cfiA* ile IS elementi birlikteliğinin şematize hali

**Resim 4.** Klasik karbonhidrat testi (Modifiye Lombard Dowell agar)

**Resim 5.** *cfiA* ve IS1187 çalışılan kökenler–1

**Resim 6.** *cfiA* ve IS1187 çalışılan kökenler–2

**Resim 7.** Önünde IS1187'nin yer aldığı *cfiA* pozitif kökenler

## TABLolar DİZİNİ

**Tablo 1.** Antibiyotiklerin sulandırılmaları ve duyarlılık sınır değerleri

**Tablo 2.** Direnç genleri, IS elementlerinin primer dizileri, PZR koşulları

**Tablo 3.** *Bacteroides fragilis* grubu bakterilerinin izole edildiği klinik örnek türleri

**Tablo 4.** Klasik yöntemlerle; katalaz, indol oluşturma ve karbonhidratları kullanma reaksiyonlarına göre BFG bakterilerin tanımlanması

**Tablo 5.** Rapid ID 32 A (bioMérieux- France) ile klasik yöntemlerin *B.uniformis/ovatus*'u tanımlaması

**Tablo 6.** Örnek sayılarına göre BFG bakterilerin tür dağılımı

**Tablo 7.** İmipenem, meropenem ve metronidazol ile yapılan agar dilüsyon yönteminde saptanan MİK değerleri

**Tablo 8.** BFG bakterilerde, türlerin imipenem ve meropenem duyarlılıkları

**Tablo 9.** BFG bakterilerin antibiyotiklerin duyarlılık sonuçları ve MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> değerleri

**Tablo 10.** *B. fragilis* ve *B. fragilis*-dışı BFG bakterilerin MİK 50 ve MİK 90 değerleri

**Tablo 11.** Karbapeneme dirençli kökenlerde tür ve MİK değerleri

**Tablo 12.** *cfiA* geni ,IS1187 ile IS4351 pozitif kökenler ve MİK değerleri

**Tablo 13.** *cfiA* varlığına göre *B. fragilis* kökenlerinin MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri

**Tablo 14.** *cfiA* geni ve IS1187 pozitifliklerine göre kökenlerin karbapenemlere karşı MİK dağılımının karşılaştırılması

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Anaerop bakteriler ciddi hatta ölümcül enfeksiyonlara yol açabilmektedirler. Anaeroplara bağlı enfeksiyonların çoğu, kişinin kendi mikroflorasından kaynaklanmaktadır (1). Kolon florasının önemli bir bölümünü oluşturan *Bacteroides fragilis* grubu (BFG) bakteriler karışık bakteri enfeksiyonlarından en fazla izole edilen anaerop patojenler arasında yer almakta ve sıklıkla batın içi apselerine veya bakteriyemiye neden olmaktadır (2).

Geçmiş yıllarda, aerop ve anaerop bakterilerin birlikte oluşturdukları enfeksiyonların tedavisinde klindamisin ve gentamisin kombinasyonu yaygın olarak kullanılmaktaydı. Ancak son dönemlerde BFG bakterileri başta olmak üzere anaerop bakterilerin antibiyotiklere, özellikle klindamisin ve bazı  $\beta$ -laktamlara giderek artan oranda direnç geliştirdikleri saptanmıştır (3, 4).

*Bacteroides fragilis* grubu bakteriler, anaerop bakteriler içinde antibiyotiklere en fazla direnç gösterenler olup, bu bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde uygun antibiyotiğin seçilmesi zorluk arz etmektedir. Üretilmeleri, tanımlanmaları ve antibiyotik duyarlılık testleri zor, zahmetli, zaman alıcı olduğu, özel üretme koşullarını gerektirdiği için pek çok hastanede rutinde anaerop kültürü ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılmamaktadır. Bu nedenle anaerobik enfeksiyon düşündürülen durumlarda ampirik tedavi uygulanmaktadır (4). Pek çok antibiyotiğe direnç gösteren BFG bakteriler, karbapenemler,  $\beta$  laktam-  $\beta$  laktamaz inhibitörleri ve metronidazol gibi sınırlı sayıda antibiyotiğe duyarlıdırlar. Son yıllarda dünyanın bazı ülkelerinde bu antibiyotiklere dirençli kökenler saptanmıştır. Özellikle Japonya gibi Uzakdoğu ülkelerinde, karbapenemler de dahil pekçok  $\beta$ -laktam antibiyotiği parçalayabilen metallo- $\beta$ -laktamaz üreten BFG kökenleri bildirilmiştir. Karbapenemazların üretimi *cfiA* geni tarafından kodlanmakta, genin yüksek düzeyde ekspresyonu hemen önünde yer alan "Insertion Sequences" (IS) elementleri tarafından

gerçekleştirilmektedir. Metronidazol direnci ise *nim* genleri tarafından kodlanmakta olup bazı IS elementleri bu genlerin ifadesinde rol oynamaktadır (5).

*Bacteroides fragilis* grubu bakterilerde direnç, kromozomal mutasyon ya da direnç genlerinin plazmid veya konjugatif transpozon gibi DNA elementleriyle horizontal aktarımıyla gerçekleşmektedir (5). Karbapenemaz enzimini kodlayan *cfiA* geni bakteri kromozomunda, metronidazole direncinden sorumlu *nim* genlerinden bir kısmı bakteri kromozomunda bazıları da plazmid üzerinde bulunmaktadır. Her iki antibiyotiğe direnci kodlayan genlerin hemen önünde, bu genleri aktive edebilen mobil IS elementleri bulunabilmektedir. Direnç genlerinin IS elementleri ile hareket edebilme yeteneğine sahip olması, bir bakteriden diğerine kolayca aktarılabileceklerini göstermekte ve gelecekte imipenem veya metronidazole dirençli BFG sayısında artış olasılığını düşündürmektedir (6). Bu tehlikeyi önlemek veya oluşacak direnci kontrol altında tutabilmek için antibiyotik direnç paternini belirli aralıklarla tayin etmek ve dirençten sorumlu genlerin durumunu yakından takip etmek gerekmektedir. Bu amaçla hastanemiz Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarının stoklarında bulunan, 1997-2008 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiş BFG bakterilerinin, imipenem, meropenem ve 5-nitroimidazole olan direnç durumu fenotipik olarak, dirençten sorumlu *cfiA* ve *nim* genlerinin ve ekspresyonu arttıran IS elementlerinin varlığı genotipik olarak araştırılmış, hastanemiz için bir veri tabanı oluşturulmaya çalışılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Anaerop Bakterilerin Tarihçesi

Anaeroplara bağılı enfeksiyonlar hakkında bilinenler millattan önceki yıllara kadar gitmektedir. M.Ö 4.yy'da Hipokrat tetanozu, M.S 4.yy'da Xenophon Yunan askerlerinde akut nekrotizan ülseratif gingiviti tanımlamışlardır. Antonie van Leeuwenhoek 1680 yılında 'animalcules' adını verdiği bazı canlıların havasız ortamda yaşayabildiklerinden söz etmiştir. 1861'de Louis Pasteur *Clostridium butyricum*'u keşfettiği sırada, mikroskop altında ıslak preparatlarda bakterinin oksijen ile temas eden alanlarda hareketini kaybettiğini gözlemlemiş ve bugünkü 'anaerobes' kelimesinin kökeni olan 'anaerobies' kelimesini ilk olarak kullanmıştır. Pasteur, ayrıca *C.butyricum*'un oksijen yokluğunda bütirik asidi fermente ettiğini tespit etmiştir. 19.yy'ın sonuna kadar hayvanlarda ve insanlarda hastalık yapabilen *Clostridium*'ların çoğu sıvı ve katı besiyerinde üretilmiş ve tanımlanmıştır (7).

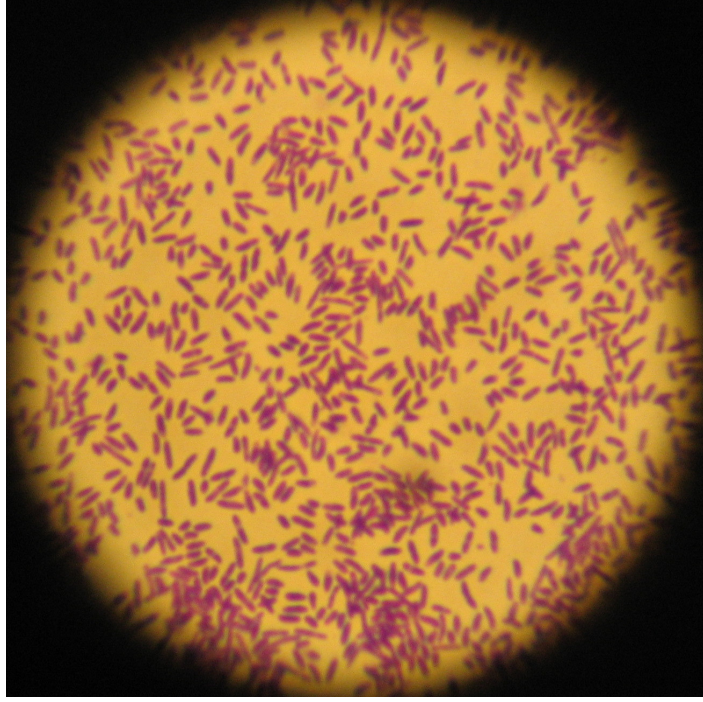
*Bacteroides* cinsi bakterilerden *B. fragilis*, Veillon ve Zuber tarafından 1898 yılında üretilmiş, *Bacillus fragilis* olarak tanımlanmıştır. Daha sonra, 1919'da Castellani ve Chalmers oluşturdukları sınıflamada *Bacteroides* cinsi içine bu bakteriyi tür olarak dahil etmişlerdir (8).

Anaerop bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde 1940'larda antibiyotikler kullanılmaya başlanmış, bu antibiyotiklere 1970'lerde yenileri eklenmiştir (1). Ancak zaman içinde antibiyotiklere direnç gelişmiştir. *Bacteroides* cinsi bakterilerde ilk olarak 1966'da penisiline direnç saptanmış, 1972'de tetrasikline, 1976'da metronidazole, 1978'de sefoksitin ve 1983'te imipeneme dirençli olgular bildirilmiştir. Dünyanın pekçok ülkesinde çeşitli antibiyotiklere artan oranda direncin geliştiği bildirilmektedir (3,4).

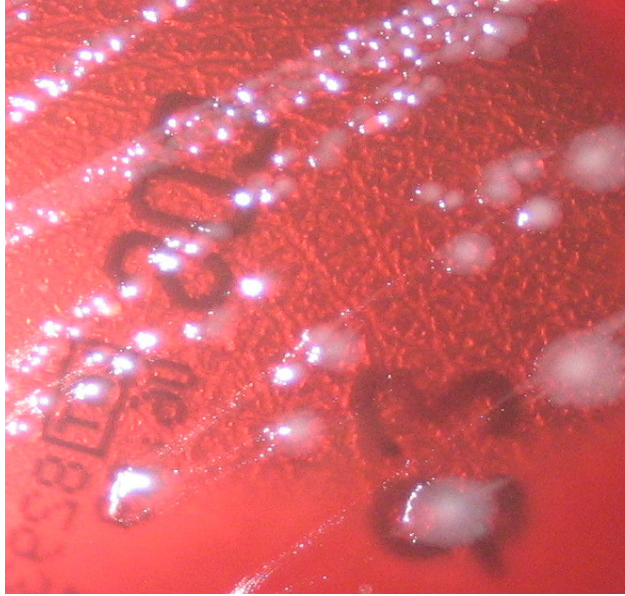
## 2.2. *Bacteroides fragilis* grubu bakteriler (BFG)

*Bacteroides* cinsi bakteriler insan ve hayvanların ağız, üst solunum yolu, barsak ve ürogenital sistemlerinin normal florasında yer alan gram negatif anaerop bakterileridir. Son yıllarda, biyokimyasal özelliklerine, nükleik asit baz kompozisyonu ve homolojisine göre gram negatif anaerop bakterilerin sınıflamasında birtakım değişiklikler yapılmış olup, halen yeni bakteriler tanımlanmakta veya sınıflamadaki yerleri değiştirilmektedir. Yaklaşık 30 yıl önce safra varlığında üreyebilen, sakkarolitik *Bacteroides* türleri, *Bacteroides fragilis* grubu olarak tanımlanmış, *B. caccae*, *B. distasonis*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. merdae*, *B. ovatus*, *B. stercoris*, *B. uniformis*, *B. vulgatus* bu grup içinde toplanmıştır. Günümüzde bu bakterilerin farklı şekilde sınıflandırılması eğilimi bulunmaktadır, *B. distasonis* ve *B. merdae*'ın 16S rRNA dizisine göre *Tannerella forsyhensis* cinsine daha yakın olduğu gösterilmiştir (9).

*Bacteroides fragilis* grubu bakteriler, %20 safrada üreyebilen, kanamisin, vankomisin ve kolistin antibiyotiklerine dirençli, hareketsiz, soluk boyanan yuvarlak uçlu, eni 0,5–0,8 µm, boyu 1,5–9 µm arasında değişen gram negatif basil ya da kokobasillerdir (Resim 1). Özellikle klinik örneklerden ya da sıvı besiyerinden hazırlanan preparatlarda pleomorfik ve vakuollü görüntüler belirgindir. Katalaz ve indol reaksiyonları ile eskülini hidrolize etme özellikleri, türlere göre değişiklik göstermektedir. Diğer yandan hepsi sakkarolitik olup fermente edebildikleri şeker cinsine göre tür düzeyinde sınıflandırılmaktadır. Bu grup bakteriler, anaerop ortamda 48 saatlik inkübasyonun ardından, koyun kanlı besiyerinde 1–4 mm çapında yuvarlak, düzgün sınırlı, konveks, gri-beyaz renkli, hemoliz yapmayan koloniler oluştururlar (Resim 2) (10).



**Resim 1.** Gram yöntemi ile boyanmış *Bacteroides fragilis*



**Resim 2.** *Bacteroides fragilis*'in %5 koyun kanlı agardaki görüntüsü

## **2.2.1. *Bacteroides fragilis* grubu Bakterilerin Enfeksiyonlarının Patogenezi**

### **2.2.1.1. Konağa ait faktörler:**

*Bacteroides fragilis* grubu bakteriler kolon florasının büyük çoğunluğunu oluşturmakta, az oranda kadın genital organlarında, nadiren ağız boşluğu ve üst solunum yolları florasında yer almaktadırlar. Travma, cerrahi, kesici ve delici alet yaralanmaları, organ perforasyonları, iskemi gibi nedenlerle mukozanın bütünlüğünün bozulması halinde bu bakteriler dokulara veya dolaşıma geçerek enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Bu sırada, bakterilerden doğrudan veya kompleman aktivasyonu ile uyarılan polimorf nüveli lökositler (PNL), anaerob bakterileri öldürebilmektedir. Ayrıca dolaşımda bulunan antikor ve kompleman sistemi devreye girerek bakteriyemi gelişimini önlenmektedir (1, 9).

### **2.2.1.2 Virülans Faktörleri**

Enfeksiyonun başlangıcı genellikle konak faktörlerine bağlı olmakla birlikte, enfeksiyonun prognozunda bakterilerin virülansı önemli rol oynamaktadır. Anaerob enfeksiyonlarında en sık izole edilen *B. fragilis* türünün BFG bakterilerinin diğer üyelerine göre daha fazla virülans özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir. Patogeneizde önemli yere sahip virülans faktörleri dört ana başlıkta incelenebilir (11–14).

## **1. Kolonizasyonu sağlayan yüzey yapıları**

**Kapsül:** Kolonizasyon ya da enfeksiyon için epitel hücrelerine tutunabilme yeteneği önemlidir. *B. fragilis*'in kapsül yapısıyla barsak mukozasına bağlanabildiği, böylece barsağın peristaltik hareketlerinden ve dışkı oluşum sürecinden etkilenmediği anlaşılmıştır (14).

**Lipopolisakkarit (LPS):** *Bacteroides fragilis* grubu bakteriler, apse oluşumuna katkı sağlayan lipopolisakkarit tabakasına sahiptirler. Ancak Lipid A kompozisyonundaki farklılık nedeniyle LPS'nin enterik bakterilerinkine göre daha zayıf etki oluşturduğu gösterilmiştir (13,14).

**Dış zar proteinleri:** *Bacteroides fragilis* grubu bakterilerinin kendilerine özgü dış zar proteinlerine sahip oldukları saptanmıştır. Proteinlerin kompozisyon ve miktarının üreme koşullarına bağlı olarak değiştiği, ortamda demirin bulunmasının, bakterinin üremesinde ve protein profilinin belirlenmesinde büyük paya sahip olduğu görülmüştür. Enfeksiyon sürecinde demiri kullanma konusunda bakteri ile konak arasında büyük bir yarışma bulunmaktadır. Demir bulunmayan ortamlarda *B. fragilis* üretildiğinde, üç protein yapımının baskılandığı, bu proteinlerden IROMP'ın antikor yapımını indüklemeye önemli işleve sahip olduğu tespit edilmiştir (14).

**Pilus ve Lektin:** Özellikle kapsülsüz suşlarda epitele tutunmadan sorumlu diğer önemli faktörlerdir (14).

## 2- İnvazyon

Epitel yüzeyine tutunan bakterinin enfeksiyon oluşturmak için izleyeceği ikinci aşama invazyondur. Bakterilerin salgıladıkları enzimler invazyonda önemlidir (11). *Bacteroides*'ler invazyona yardım eden, doku hasarı oluşturan ya da bakteriyi konak savunmasından koruyan değişik birçok enzim üretmektedir. Bunlara örnek olarak heparinaz, kondroitin sülfataz, kollajenaz, hyalüronidaz, nöraminidaz, heparinaz ve fibrinolizin verilebilir. BFG bakterilerin büyük çoğunluğu  $\beta$  laktamaz ve diğer antibiyotikleri inaktive eden enzimleri üreterek penisilin ve türevleri başta olmak üzere pekçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirirler (11,18).

### **3- Enfeksiyon alanında çoğalma ve konağın savunma sisteminden kaçma**

Periton boşluğuna geçen BFG bakterilerinin oluşturduğu inflamatuvar yanıtı bağı olarak sızan plazma, bakteri etrafında bir fibrin ağı gerçekleştirmektedir. Bu fibrin ağı, bakterinin yayılmasını dolayısıyla bakteremiye önlemekte aynı zamanda bakteriyi fagositozdan korumaktadır (15). *B. fragilis*'in polisakkarit yapısındaki kapsülü de antifagositik özelliğe sahiptir. Diğer yandan BFG bakterileri birtakım protein ve kısa zincirli yağ asitleri üreterek, fagositik hücrelerin fonksiyonlarını bozmakta ve konağın savunma sisteminden kaçabilmektedirler (16, 17).

### **4- Salgılanan toksinler**

Bazı *B. fragilis* kökenleri, özellikle çocuklarda sekretuar tipte ishale neden olan, frajilizin adı verilen ısıya duyarlı metallo-enzim yapısında sitotoksik etkiye sahip enterotoksin salgılamaktadırlar (19).

### **2.3. *Bacteroides fragilis* grubu Bakterilerin Neden Olduğu Enfeksiyonlar**

Herhangi bir nedenle mukoza bütünlüğünün bozulması durumunda, sıklıkla barsak veya jinekolojik cerrahi sonrasında batın-içi enfeksiyonları gelişmektedir. Karaciğer absesi, apendisit, kolesistit, peritonit ve intraabdominal apse gibi batın içi enfeksiyonlarında, cerrahi yara, diyabetik ve dekübit ülserleri gibi deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında, BFG bakteriler, anaerob etkenler içinde birinci sırayı almaktadır. Bu bakteriler, daha az sıklıkla, beyin absesi, menenjit, kronik otit veya sinüzit

yapabilmekte, akciğer absesi, endometrit, servisit, osteomyelit gibi birtakım enfeksiyonlara yol açmakta, mortalitesi yüksek bakteriyemilerin oluşmasına neden olabilmektedirler. Bütün bu enfeksiyonlarda *B.fragilis* birinci sıklıkta izole edilmektedir. Diğer yandan enterotoksijenik *B.fragilis* kökenleri özellikle 1–5 yaş arasındaki çocuklarda sulu ishale neden olabilmektedir (1,19).

#### **2.4. *Bacteroides fragilis* grubu Bakteri Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı**

Diğer anaeroplarda olduğu gibi BFG enfeksiyonlarının tanısı zahmetli ve zaman alıcıdır. Tanıda başarılı sonuçlar alabilmek için, uygun örneğin alınması, laboratuvara uygun şekilde ve kısa sürede gönderilmesi, laboratuvarında gerektiği gibi işleme alınması, anaerop inkübasyon koşullarının sağlanması ve uygun tanımlama yöntemlerinin seçilmesi gerekmektedir (20).

Normal flora ile kontamine olan örneklerden anaerop kültür yapmanın herhangi tanısal değeri bulunmamaktadır. Anaeroplardan kültürü için uygun olanlar, normalde steril vücut sıvıları, derin apselerden enjektör ya da iğne ile alınan aspirasyon örnekleri veya doku biyopsi örnekleridir. Örneklerin eküvyonla alınması önerilmemektedir, ancak sadece eküvyonla alınabiliyorsa, mutlaka oksijenden yoksun anaerop ortamın sağlandığı transport sistemlere konulması gerekmektedir (10,20).

Doku örneklerinin veya enjektörle alınan örneklerin (öncelikle örneklerin alınması esnasında çekilen hava şırıngadan atılmalıdır), anaerop transport besiyerine aktarılarak oda ısısında laboratuvara nakledilmelidir (10).

Laboratuvara gönderilen örneklerden uygun besiyerlerine ekim yapılmalı ve boyalı preparat hazırlanmalıdır. Gram boyalı preparatların; inflamatuvar hücreler ve bakterilerin varlığı, bakteri morfolojisindeki

farklılıklar, şekil, büyüklük ve dizilimleri hakkında verdiği bilgiler tanı için birer ipucu olabilmektedir (10).

Anaerop bakteri enfeksiyonlarının genellikle farklı morfolojiye sahip bakteriler ile oluşması nedeniyle klinik örneklerin, taze hazırlanmış kanamisinli-vankomisinli veya safralı agar gibi seçici besiyerlerine aynı zamanda seçici olmayan besiyerlerine ekilmesi önerilmektedir. Ekilmiş plakların 35-37 °C'de, 48 saat anaerop ortamda inkübe edilmesi, bu inkübasyonun sonunda plaklarda üremenin olmaması durumunda inkübasyona 5 gün daha devam edilmesi gerekmektedir. Sıvı besiyerlerinin inkübasyonu 7 gün olmalı ve her gün takip edilmelidir (10).

Kültürlerin inkübasyonunda kullanılan değişik sistemler bulunmaktadır. Bu amaçla; anaerop kabinler, kavanozlar (GasPak, gaz doldurulabilir kavanozlar) ve plastik torbalar kullanılmaktadır (10).

Kültürlerde oluşan kolonilerin özellikleri (çap, şekil, renk, yüzey özellikleri, hemoliz olup olmadığı) incelenip, her bir farklı koloninin gerçek anaerob olup olmadığı aerotolerans testi ile belirlenmelidir. Aerotolerans testi sonucuna göre zorunlu anaeroblardan Gram boyama yönteminde, soluk ve düzensiz boyanan, tek ya da çiftler halinde bulunan, yuvarlak uçlu gram negatif basil ya da kokobasiller, BFG bakteriyi düşündürmektedir. Tanımlama amacıyla kullanılan kanamisin, vankomisin ve kolistin antibiyotiklerine dirençli olan bu bakterilerin biyokimyasal özelliklerine, karbonhidratları fermente etme durumlarına göre tür düzeyinde tanımlanmaları yapılmaktadır. Bu testlerin yeterli olmadığı durumlarda veya araştırmalarda gaz-likit kromatografisi ile metabolizmaları sırasında oluşan ürünler veya bakteri yağ asitleri kompozisyonu tayin edilerek veya moleküler testler ile bakteri için özgün kısımların gen dizisi belirlenerek daha ileri tanımlamalar da yapılabilmektedir (9).

Bakteriyemi, eklem enfeksiyonları, protez enfeksiyonları, osteomyelit ya da beyin apsesi gibi özel durumlar dışında, rutinde

antimikrobiyal duyarlılık testinin yapılması birçok hasta izolatu için gerekmebilir. Antimikrobiyal duyarlılık testinin yapılmasının gerekli olduğu durumlarda CLSI (M11-A7)'nin önerdiği agarda dilüsyon ya da sıvıda dilüsyon yöntemleri kullanılmalıdır. Agarda dilüsyon yöntemi tüm anaerop bakteriler için uygulanabilir iken, sıvıda dilüsyon sadece BFG bakteriler için önerilmektedir. Her iki yöntemin de zor, zahmetli ve zaman alıcı olmaları nedeniyle daha çok surveyans araştırmalarında kullanılmaları tercih edilmektedir (21).

Acil ve özel durumlarda, CLSI tarafından önerilmeyen ancak FDA tarafından onaylanan E-test yöntemi antimikrobiyal duyarlılığın saptanması için kullanılabilir (22).

## **2.5. Antimikrobiyal Tedavi**

Birçok laboratuvarında rutinde, anaerop bakterilerin antibiyotiklere duyarlılık testleri yapılmamakta ve enfeksiyonların tedavisine ampirik olarak başlanılmaktadır. *Bacteroides fragilis* grubu bakterilere karşı en etkili antibiyotikler, karbapenemler, metronidazol, kloramfenikol,  $\beta$ -laktamaz inhibitörlü  $\beta$ -laktam antibiyotikler, yeni türev kinolonlar ile sefalosporinlerden sefoksitin ve sefotetan'dır. Ancak, günümüzde bu antibiyotiklere karşı da direnç gelişimi bildirilmektedir (23).

## 2.5.1. *Bacteroides fragilis* grubu Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

### 2.5.1.1. $\beta$ -laktam antibiyotiklere direnç

$\beta$ -laktam grubu antibiyotikler, penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlar olmak üzere dört grupta toplanmıştır. Bu antibiyotiklere karşı direnç üç mekanizma ile gelişmektedir. Bunlar, penisilin bağlayan proteinlerde değişikliğin oluşması (BFG'lerdeki  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin bağlandıkları proteinler genellikle PBP2Bfr'dir), dış membran proteinlerinde (OMP) oluşan değişikliklere bağlı geçirgenliğin azalması ve  $\beta$ -laktamaz üretimidir. Bazı *B. fragilis* kökenlerinde  $\beta$ -laktamaz üretimi ile geçirgenliğin azalması birlikte görülebilmekte ve bu yüksek düzeyde dirence neden olmaktadır (24–26).

*Bacteroides fragilis* grubu bakterilerde iki tip  $\beta$ -laktamaz enzimi; moleküler sınıf A'da bulunan kromozomal  $\beta$ -laktamazlar ile moleküler sınıf B'de bulunan kromozomal  $\beta$ -laktamazlar üretilebilmektedir (24).

Bunlardan penisilin ve sefalosporinlere karşı direnç gelişimine yol açan moleküler sınıf A  $\beta$ -laktamazlar *Bacteroides*ler arasında yaygın olarak bulunmaktadır. Sınıf A  $\beta$ -laktamazlar, aktif bölgelerinde serin taşırlar ve sefalosporinaz geni (*cepA*) tarafından kodlanırlar. Klasik  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerinden etkilenirler. Penisiline dirençli ilk olgu 1966'da, sefoksitine dirençli olgu ise ilk kez 1983'te bildirilmiştir (24, 25) .

*Bacteroides fragilis* grubu bakterilerde daha az sıklıkla bulunan ve karbapenem direncinden sorumlu  $\beta$ -laktamazlar, moleküler sınıf B'de, Bush sınıflamasında grup 3a'da yer almaktadırlar. Aktif bölgelerinde  $Zn^{+2}$  bulunduran metallo- $\beta$ -laktamaz yapısındaki bu enzimler, EDTA varlığında inhibe olurken, klasik  $\beta$ -laktamazlar inhibitörlerinden etkilenmezler.

Monobaktamlar dışında, karbapenemler de dahil olmak üzere tüm  $\beta$ -laktamları hidrolize ederler (27). Dirençten sorumlu gen, *cfiA* olup kromozomda yer alırlar. *cfiA* direnç geni, 'sessiz' olabileceği gibi değişik düzeylerde metallo- $\beta$ -laktamaz ifade edebilir. Insertion Sequences (IS) elementi adı verilen hareketli bir DNA parçasının sessiz *cfiA* geninin hemen ön kısmına eklenmesiyle, direnç geni uyarılarak enzim üretimine başlayabilmektedir. Sessiz *cfiA* genini uyaran IS elementleri arasında IS942, IS1169, IS1186, IS1187, IS4351 sayılabilir (24, 28, 29). Karbapenem dirençli ilk olgu 1983'te bildirilmiş olup, günümüzde direnç %1 -4 oranında değişmektedir.

BFG bakterilerdeki monobaktam direnci, antibiyotiğin PBP'lere olan zayıf affinitesinden kaynaklanmaktadır (4).

$\beta$  laktam- $\beta$  laktamaz inhibitörlü antibiyotikler BFG bakteriler üzerine etkili olup cilt, yumuşak doku, jinekolojik ve batın içi enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir. Sefaperazon-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, tikarsilin-klavulanik asit ve ampisilin-sulbaktama direnç BFG bakterilerinde yaklaşık % 0,5 oranında bildirilmiştir (30).

#### **2.5.1.2. 5-nitroimidazole karşı direnç**

*Bacteroides fragilis* grubu bakterilere etkili olan diğer antibiyotik metronidazol, 5- nitroimidazol türevidir ve güçlü anaerobisidal etkiye sahiptir. Metronidazol, bir ön ilaç olup ilacın etkin hale geçmesi için nitro grubunun indirgenmesi gerekmektedir. BFG bakterilerdeki 5-nitroimidazol direncinin, *nim* (A-E) olarak adlandırılan direnç genleri tarafından kodlanan 'nitroimidazol redüktaz' enzimine bağlı olduğu gösterilmiştir (31, 33).

Nitroimidazol redüktaz enzimi, nitro grubunun indirgenmesini önlemekte ve metronidazolün bakterisidal etkinliğini ortadan kaldırmaktadır. *nim* genleri plazmid ya da kromozomlar tarafından kodlanabilmektedir (33). Metronidazol *nim* direnç genlerinin, hareketli DNA parçaları olan Insertion Sequences (IS) elementleri (IS942, IS1168,

IS1169, IS1170, IS1186, IS4351) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (32, 34). BFG bakterilerde, *nim* genlerinin var olmasına karşın, metronidazol duyarlı olarak tanımlanan düşük minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri saptanabilmektedir. Bu durum, kökenlerde *nim* genlerinin ifade edilemediğini ya da çok düşük düzeylerde ifade edildiğini göstermektedir. *nim* genlerinde oluşacak bir mutasyon ile ya da IS elementinin *nim* gen ön bölgesine eklenmesiyle, sessiz olan *nim* geni uyarılarak enzim üretimine neden olup, bakteriyi metronidazole dirençli hale getirebilecektir (35, 36). Metronidazole dirençli ilk olgu 1978'de bildirilmiş olup direnç oranı günümüzde halen %1'in altındadır (4).

### **2.5.1.3. Diğer antibiyotiklere karşı direnç**

#### **Kloramfenikol direnci**

*Bacteroides fragilis* grubu bakterilerde kloramfenikol direncine, kloramfenikolü modifiye eden ' kloramfenikol asetil transferaz-CAT ' enziminin sentezi neden olmaktadır. Modifiye olan kloramfenikol ribozoma bağlanamayıp etkisini gösteremez. *Bacteroides fragilis* grubu bakterilerde kloramfenikol direnci %1'in altındadır.

#### **Kinolon direnci**

Kinolonların anaerob bakterilerde pek etkili olmadıkları, ancak son yıllarda yeni elde edilen ürünlerin iyi sonuçlar verdiği bildirilmektedir. Direnç gelişimi, geçirgenliğinin azalması sonucu antibiyotiğin bakteri içine girememesine bağlanmaktadır (4).

## **Aminoglikozid direnci**

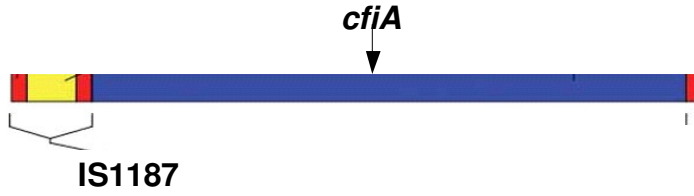
Anaerop bakterilerde elektron transport sistemi bulunmadığından, bu sistem ile hücre içine girebilen aminoglikozitlere anaerob bakteriler doğal olarak dirençlidirler (4).

### **2.5.2. *Bacteroides fragilis* grubu Bakteriler ve Insertion Sequence (IS) elementleri**

IS elementi, ilk kez 1978'de tanımlanan, 2.5 kb'den küçük, basit bir genetik organizasyona sahip, hedef DNA'ya birçok bölgeden eklenebilme yeteneğinde olan bir transpozondur. Bakteri kromozomu, plazmid ya da bakteriyofaj genomunda bulunabilir ve yer aldıkları DNA dizisi çoğaldığında çoğalabilirler. Ters tekrarların olması ve hareketi sağlayan transpozaz enzimini kodlayan bir genin bulunması en önemli iki özelliğidir. Yetmiş bakteri cinsinin 159 türünden 500'den fazla IS elementi tanımlanmış ve genetik organizasyonları, transpozaslardaki benzerlik, terminal kısım ile hedef bölgeye olan özgüllüklerine göre 17 aileye ayrılmışlardır. IS elementleri kapsadıkları genlerle beraber, buldukları DNA bölgesinden yine aynı DNA üzerinde farklı bir bölgeye hareket edebildikleri gibi; plazmid ya da bakteriyofaj ile bir başka bakteriye taşınabilirler. IS elementlerinin çoğunun komşu gen ifadesini uyardığı gösterilmiştir (34).

*Bacteroides fragilis* grubu bakterilerde, IS942, IS1168, IS1169, IS1170, IS1186, IS1187 ve IS4351 gibi IS elementleri tanımlanmıştır. IS942 ve IS1170, IS4 ailesine; IS1168, IS1169 ve IS1186, IS5 ailesine; IS4351 ise IS30 ailesine üyedirler (28, 29, 32, 34).

IS942, IS1186 ve IS1187 karbapenemlere dirençli kökenlerde *ccrA* ve *cfiA* direnç genlerinin, IS1170 ise metronidazole dirençli kökende *nim C* direnç geninin hemen önünde yer almaktadır. Diğer elementlerden IS1186'nın *nimA*, IS1169'un ise *nimD* direnç genlerinin ön bölgesinde buldukları gözlenmiştir (32).



**Resim 3.** *cfmA* ile IS elementinin birlikteliğinin şematize hali

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. GEREÇLER:

##### 3.1.1. Standart kökenler:

1. *Bacteroides fragilis* ATCC 25285
2. *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741
3. *B. fragilis nimA* (*nimA*, IS1186 ve IS4351 (+) kontrol kökeni) \*
4. *B. fragilis nimB* (*nimB* ve IS1168 (+) kontrol kökeni) \*
5. *B. fragilis nimC* (*nimC* ve IS1170 (+) kontrol kökeni) \*
6. *B. fragilis nimD* (*nimD*, IS1169 ve IS942 (+) kontrol kökeni) \*
7. *B. fragilis nimE* (*nimE* (+) kontrol kökeni) \*

\* *B. fragilis nim A, nim B, nim C, nim D* ve *nimE* (+) kontrol kökenleri Prof.Dr. Elizabeth Nagy (Szeged Üniversitesi, Klinik Mikrobiyoloji Enstitüsü, Szeged, Macaristan) tarafından temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Besiyeri:

1. % 5 koyun kanlı Columbia agar (bioMérieux-France)
2. Brucella buyyon (Becton Dickinson)
3. Brucella agar (Becton Dickinson)
4. Tiyoglikolatlı buyyon (Oxoid)
5. Modifiye Lombard-Dowell Agar

### **Zenginleştirilmiş Brucella Buyyon (21):**

Brucella buyyon tozu 28 gr  
Hemin stok solüsyonu 1 ml  
K vitamin (1/10'luk sulandırımından) 1 ml

1000 ml distile su ile karışım çözülünceye kadar ısıtılıp, ardından soğutularak pH ölçümü yapılmış (pH:7.2–7.4) ve cam tüplere 2,5 ve 4,5 ml olacak şekilde konulup, otoklavda 15 dakika steril edilmiştir.

### **Zenginleştirilmiş Brucella Agar (21):**

Brucella Agar tozu 43 gr  
Hemin stok solüsyonu 1 ml  
K vitamini (1/10'luk sulandırımından) 1 ml

1000 ml distile su ile karışım çözülünceye kadar ısıtılıp, ardından soğutularak pH ölçümü yapılmış (pH:7.2–7.4) cam balonlar içinde otoklavda 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerinin 50°C'ye kadar soğuması beklenildikten sonra üzerine %5 oranında koyun kanı eklenmiştir.

### **Tiyoglikolatlı Buyyon (21):**

Rezasurinsiz Tiyoglikolatlı buyyon tozu 30 gr  
Hemin stok solüsyonu 1 ml  
K vitamin (1/10'luk sulandırımından) 1 ml

1000 ml distile su ile karışım çözülünceye kadar ısıtılıp, ardından 5'er ml cam tüplere konularak otoklavda 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerine ekim yapılmadan önce her tüpe 0.25 ml sodyum bikarbonat stok solüsyonu eklenmiştir.

**Modifiye Lombard-Dowell Agar** (38' nolu kaynaktan laboratuvarımıza uygun şekilde modifiye edilmiştir)

Triptikaz 5 gr	Maya özütü 5 gr
Sodyum klorid 2.5gr	Sodyum sülfid 0,1 gr
L- triptofan 0,2 gr	Hemin stok solüsyonu 1 ml
L- sistin 0,4 gr	K vitamini çalışma solüsyonu 1 ml
Agar 20 gr	Distile su 1000 ml

Gerekli maddeler tartıldıktan sonra karıştırılmış ısıtılarak eritilmiş (suda çözünmeyen L- triptofan ve L-sistin karışıma eklenmeden önce 2'şer ml 1 N NaOH'da çözdürülmüştür) ve pH 7,4'e ayarlanmış, 100'er ml cam balonlara ayrılmıştır. Farklı şekerlerden 0,3 gr farklı balonlara eklenerek 115 °C'de 10 dakika otoklavlanmıştır. Ardından besiyerinin 50 °C'ye kadar soğuması beklenmiş, hücre kültürleri için kullanılan 24 kuyucuklu steril plastik kapların herbir kuyucuğuna 1'er ml besiyerinden konulup, katılaşmaya bırakılmıştır.

### **3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler, diskler, kitle:**

1. Vankomisin disk (5 µg)
2. Kanamisin disk (1000 µg)
3. Kolistin disk (10 µg)
4. Anaerogen (Oxoid)
5. Karbonhidratlar (Trehaloz, Salisin, Ksilan, Arabinoz, Sellobiyoz, Ramnoz) ( Sigma)
6. Triptikaz (BD Bacto)
7. Maya özütü (Fluka)

8. Sodyum klorit (Merck)
9. Sodyum sülfid (Merck)
10. L- triptofan (Sigma)
11. L- sistin (Sigma)
12. Hemin stok solüsyonu (5 mg/ml) (Fluka)
13. K<sub>1</sub> vitamini stok (10 mg/ml) ve çalışma (1 mg/ml) solüsyonları (Konakion-Roche)
14. Sodyum hidroksit (Merck)
15. Bromtimol mavisi (Aldrich)
16. Rapid ID 32 A (bioMérieux- France)
17. Nit1 + Nit2 (bioMérieux- France)
18. James (bioMérieux- France)
19. FB (bioMérieux- France)
20. Suspansiyon besiyeri (bioMérieux- France)
21. Hidrojen Peroksit (Merck)
22. Paradimethylaminocinnamaldehyde (Aldrich)
23. Metronidazol toz (Sigma)
24. İmipenem toz (Merck)
25. Meropenem toz (Zeneca)
26. %95 etil alkol (Sigma)
27. PBS pH:7,2
28. Dimetil sülfoksit (Fluka)
29. % 5 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck)
30. Distile su
31. NaHCO<sub>3</sub> (Merck)
32. Defibrine koyun kanı

33. NaOH ( Merck )
34. HCl ( Merck )
35. EDTA ( Sigma )
36. Tris-HCl ( Sigma )
37. Agaroz ( Sigma )
38. Etidyum bromid ( Sigma )

**Hemin stok solüsyonu (10):**

0.1 gr hemin, 2 ml 1 N NaOH ile çözüldü, üzerine 20 ml distile su eklendi, 121 °C'de 15 dk otoklavlandı. Stok solüsyon 4–8°C'de, ışıktan korunacak şekilde saklandı.

**K<sub>1</sub> vitamini stok solüsyonu (10):**

0.2 ml K<sub>1</sub> vitamini, 20 ml % 95'lik etanole eklendi. Stok solüsyon 4–8°C'de, koyu renkli şişede saklandı. 1/10'luk sulandırımı çalışmada kullanıldı.

**Sodyum bikarbonat stok solüsyonu (21):**

2 gr NaHCO<sub>3</sub> 100 ml distile suda çözüldü, 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi. Stok solüsyon çalışmanın yapılacağı gün hazırlandı.

**Bromtimol mavisi ayıracı (38):**

1 gr toz bromtimol mavisi 100 ml etil alkolde çözüldü.

**İndol ayıracı (10):**

1 gr paradimethylaminocinnamaldehyde 100 ml %10'luk HCl'de çözüldü. 4–8°C'de, koyu renkli şişede saklandı.

### 3.1.4. PZR Malzemeleri:

1. 100 bp Ladder DNA ( MBI Fermentas )
2.  $\lambda$  DNA ( MBI Fermentas )
3. 6 x Loading Dye ( MBI Fermentas )
4. 5xTBE tampon ( Tris, EDTA, Borik asit)
5. 1xTBE tampon ( Tris, EDTA, Borik asit)
6. 2x PCR Master karışımı ( MBI Fermentas )
7. DNaz - RNaz içermeyen distile su ( MBI Fermentas )
8. 0,2 ml, 0,5 ml ve 1,5 ml'lik ependorflar ( DNaz -RNase içermeyen ) (AXYGEN)
9. Sarı ve mavi pipet uçları (500, 200, 100  $\mu$ l) ( DNaz -RNase içermeyen) (AXYGEN)
10. Beyaz pipet uçları (2  $\mu$ l) ( DNaz -RNaz Free ) (USA-SCIENTIFIC)
11. Eldiven ( Beybi )
12. cfiA, nim, IS1169, IS1170, IS1186, IS1187, IS4351 revers ve forward primerleri (IDT-Integrated DNA Technologies, USA)

### 3.1.5. Kullanılan araçlar, aygıtlar:

1. AnaeroGen bag, AnaeroGen box (Oxoid)
2. Anoxomat cihazı (Mart<sup>®</sup> Microbiology B.V.)
3. Etüv ( Binder, Dedeoğlu )
4. Işık mikroskobu ( Olympus)
5. Otomatize sistemler-miniApi (bioMérieux)
6. Vorteks ( Elektromag, Yellow line )
7. Santrifüj ( Hettich )
8. Kaba terazi ( Scaltec )
9. Su banyosu ( Elektromag )
10. pHmetre cihazı ( Hana Instruments )
11. Otoklav ( Hirayama )

12. Pastör fırını ( Kermanlar, Elektro mag )
13. Mikrodalga fırın ( BEKO )
14. Termal Döngü Cihazı ( Techne, BIO RAD)
15. Elektroforez tankı ve cihazı ( Biometra )
16. UV görüntüleyicisi ( Vilber Lourmant )
17. (- 20 °C) Derin dondurucu ( Arçelik, Uğur )
18. (- 45 °C) Derin dondurucu ( Fiocchetti )
19. Buzdolabı ( Arçelik )
20. Tek kanallı otomatik pipet (Socorex, Thermo)
21. Pastör pipeti
22. Deney tüpü
23. Pipet ucu (Sarı, mavi, beyaz )
24. Sporlar
25. Steril plastik ve cam petri, cam balonlar, otomatik ve cam pipetler, lamlar
26. 24 kuyucuklu hücre kültür plakları

### **3.2. YÖNTEMLER:**

Marmara Üniversitesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı stoklarında bulunan, 1997-2008 yılları arasında klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiş BFG bakteriler çalışmaya alınmıştır. Çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'nun 06.11.2008 tarihli onayı alınarak yapılmıştır (MAR. YÇ.2008,0231). Örneğin cinsi, gönderilen servis veya poliklinik gibi hastaya ait bazı bilgiler hastane bilgisayar sisteminden alınmıştır.

#### **3.2.1. *Bacteroides fragilis* grubu Bakterilerin**

##### **Tanımlanması**

“Skimmed Milk” besiyerinde, derin dondurucuda, -80 °C’de stoklanmış olan bakterilerden %5 koyun kanı bulunduran besiyerlerine ekilmiş anaerop

ortamda, 35–37°C'de, 48 saat inkübe edilmiştir. Kùltürlerde oluşan koloni morfolojisi, Gram boyanma özellikleri, biyokimyasal reaksiyonları, antibiyotik tanımlama disklerine duyarlılıklarına göre bakteriler tür düzeyinde ayırt edilmeye çalışılmıştır.

Aerotolerans testiyle zorunlu anaerop oldukları teyid edilen, soluk ve düzensiz boyanan, gram negatif basil veya kokobasil morfolojisine sahip bakteri kolonilerinden kanlı agara yayılarak üzerine yerleştirilen 5 µg vankomisin, 1000 µg kanamisin ve 10 µg kolistin disklerine ('An-ident Discs' -Oxoid) anaerobik ortamda, 35-37°C'de, 48 saat inkübasyon sonrası dirençli olan bakteriler BFG olarak değerlendirilmiştir. Bakterilerin katalaz (%3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O oluşturan) enziminin varlığı ve indol açığa çıkarma özellikleri araştırılmış, klasik yöntemlerle karbohidratları kullanma, rapid ID 32 A (bioMérieux- France) ile ise biyokimyasal özelliklerine bakılarak bakteriler tür düzeyinde tanımlanmıştır.

Klasik karbonhidrat testinde, bakterinin arabinoz, sellobiyoz, trehaloz, ksilan, ramnoz ve salisini kullanma özellikleri araştırılmıştır, bu amaçla laboratuvarımız koşullarına uyarlanmış, her bir bakterinin kendi reaksiyonunu değerlendirmek için hücre kültürü plaklarına dökülmüş Lombard-Dowell besiyeri kullanılmıştır (38). BFG olarak tanımlanan her bakterinin, %9'luk steril tuzlu su ile Mc Farland 1 bulanıklığına göre hazırlanan süspansiyonlarından farklı şeker bulunduran her bir kuyucuğa 5'er µl damlatılmıştır. Plaklar 35–37°C'de 48 saat anaerop ortamda inkübe edildikten sonra, kuyucuklara 1'er damla bromtimol mavisini ayırıcı damlatılarak asit oluşum araştırılmıştır. Ayıraç, asidik ortamlarda sarı, pH 7 ve üzerindeki ortamlarda yeşil renk almaktadır (Resim 4).

Bakteriler ayrıca, dehidrate edilmiş substratları taşıyan, toplam 29 parametrenin değerlendirildiği rapid ID 32 A (bioMérieux- France) ile test edilmiş, ortaya çıkan metabolik ürünlere göre tanımlanmıştır. Anaerob ortamda üretilen bakterilerden Mc Farland 4 bulanıklığına eşdeğer olacak şekilde hazırlanan süspansiyondan her bir kuyucuğa 55 µl eklenerek (ürelili

kuyucuk 2 damla mineral yağ ile örtülmüştür) aerob ortamda 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Bunları takiben, üretici firmanın önerdiği şekilde kuyucuklara uygun ayıraçlar ekleyerek açığa çıkan reaksiyonlara göre değerlendirmeye gidilmiştir.

### 3.2.2. İmipenem, meropenem ve 5-nitroimidazol duyarlılığının saptanması (Agarda dilüsyon yöntemi)

CLSI'nın anaerop bakteriler için önerdiği agarda dilüsyon yöntemi (M11-A7) ile bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları araştırılmıştır (21). Çalışmada imipenem, meropenem ve metronidazol antibiyotikleri uygun sıvılarda çözdürülüp, 5120 µg/ml olacak şekilde stok solüsyon hazırlandıktan sonra ikişer misli azaltılarak hazırlanan seri sulandırmaları, %5 oranında koyun kanı bulunduran hemin ve K vitamini ile zenginleştirilmiş Brucella agar ile 0.03 – 128 µg/ml arasındaki değerler elde edilecek şekilde karıştırılmıştır (Tablo 1 ).

**Tablo 1:** Antibiyotiklerin sulandırmaları ve duyarlılık sınır değerleri

Antibiyotik	Çözücü	Sulandırım sıvısı	Sulandırım aralığı (µg/ml)	MİK değerleri (µg/ml)		
				Duyarlı	Orta dirençli	Dirençli
İmipenem	PBS pH: 7,2	PBS pH: 7,2	0.03–128	≤ 4	8	≥16
Meropenem	%5 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Distile su	0.03–128	≤ 4	8	≥16
Metronidazol	DMSO	Distile su	0.03–128	≤ 8	16	≥32

Çalışmaya alınan bakterilerin ve *B. fragilis* ATCC 25285, *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 kontrol kökenlerinin kanlı agardaki 48 saatlik taze kültürlerinden tiyoglikolatlı sıvı besiyerine ekim yapılmış, 35° C'de 24 saat anaerob ortamda inkübe edilmiştir. Elde edilen kültürden Brucella sıvı besiyerine Mc Farland 0,5 bulanıklığına gelinceye kadar eklenmiş, daha sonra oluşan bu bakteri süspansiyonundan 500 µl, 4,5 ml

brusella sıvı besiyerine aktarılarak 10 misli sulandırımı yapılmıştır. Hazırlanan bu bakteri süspansiyonlarından, düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru antibiyotik içeren Brucella agar plaklarına 10'ar µl inoküle edilmiş, kurumasını takiben 48 saat, 35 °C'de anaerob ortamda inkübe edilmiştir. Aynı zamanda bakteri süspansiyonlarından, inokülasyonun başlangıcında ve sonunda ikişer tane antibiyotik içermeyen Brucella agara ekim yapılmış, birer tanesi aerob diğerleri anaerob ortamda inkübe edilmiştir, böylece işlem sırasında veya öncesinde kontaminasyonunun olup olmadığı kontrol edilmiştir (21).

Duyarlılık sonuçları CLSI (M11-A7) kriterleri göz önüne alınarak değerlendirilmiştir. Üremenin olmadığı veya çok silik görünümde bir üremenin olduğu ya da birkaç küçük koloninin bulunduğu ilk sulandırım minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak kabul edilmiştir (21).

### 3.2.3. Moleküler Yöntemler

Bakteri DNA'sı elde etmek için; negatif kontrol olarak *B. fragilis* (ATCC 25285), pozitif kontrol olarak *B. fragilis nimA* (*nimA*, IS1186 ve IS4351+), *B. fragilis nimB* (*nimB* ve IS1168 +), *B. fragilis nimC* (*nimC* ve IS1170+), *B. fragilis nimD* (*nimD*, IS1169 ve IS942 +), *B. fragilis nimE* (*nimE* +) kökenlerinden ve çalışmaya alınan kökenlerimizden 4–5 koloni alınarak, DNaz, RNaz bulundurmeyen su (200 µl) içinde süspense edilmiş ardından 20 dakika, 95 °C'de ısıtılmış ve 12.000 rpm'de, 2 dakika santrifüj edilerek üst kısım kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ile *cfiA*, *nim*, IS elementlerinden; IS1170, IS1169, IS1186, IS1187 ve IS4351'e özel "forward" ve "reverse" primerleri ile aşağıda belirtilen reaksiyon koşulları kullanılarak direnç genlerinin veya IS elementlerinin varlığı araştırılmıştır (Tablo 2). Elde edilen PZR ürünleri, etidyum bromid içeren %2'lik agaroz jelde ve 1xTBE tamponu içinde 90 V'de 1 saat yürütülmüş ve oluşan bantlar UV ışığı altında gözlemlendikten sonra yorumlanarak fotoğrafları çekilmiştir (39, 40).

**Tablo 2:** Direnç genleri, IS elementlerinin primer dizileri, PZR koşulları

Primerler	Yön*	DNA dizisi	Kyn**	Reaksiyon Karışımı	Reaksiyon Koşulları
<i>cfiA-3</i>	R	5'-GGTTGTTGATAACAATCATCCC-3'	39	PCRMaster karışımı 12,5 µl <i>cfiA-F</i> 1 µl <i>cfiA-R</i> 1µl DNA 1µl Distile su 9,5 µl	94°C'de 2 dk 94°C'de 45 sn 65°C'de 45 sn } 35 72°C'de 45 sn } döngü 72°C'de 2 dk
<i>cfiA</i>	F	5'-TTTCCCTGTCGCAGTTATGG-3'			
	R	5'-GACCAGCATTTCGGTTTGTG-3'			
<i>nim-3</i>	F	5'-ATGTTTCAGAGAAATGCGGCGTAAGCG-3'	40	PCRMaster karışımı 12,5 µl <i>nim-3</i> 1 µl <i>nim-5</i> 1µl DNA 1µl Distile su 9,5 µl	95°C'de 2 dk 94°C'de 45 sn } 30 42°C'de 45 sn } döngü 72°C'de 1 dk
IS1169	F	5'-TGAGTCAGAGAATCGTG-3'	39		
	R	5'-CGACTGATGTTATACAC-3'			
IS1170	F	5'-CTTCTGTGTGTCATGAG-3'	39		
	R	5'-GTGTTGAAGACATATCC-3'			
IS1186	F	5'-GAGAATCAATCGTCTCGCCTT-3'	39	PCRMaster karışımı 12,5 µl IS-F 1 µl IS-R 1µl DNA 1µl Distile su 9,5 µl	95°C'de 5 dk 94°C'de 30 sn } 35 48°C'de 1 dk } döngü 72°C'de 1 dk } 72°C'de 10 dk
	R	5'-CGCCACATTCGCCTTTGCCCGTA-3'			
IS1187	F	5'-CGTATTGCAGAATGGTAAGTGC-3'	40		
	R	5'-GTTCCACGTCGTGGTCTGTTC-3'			
IS4351	F	5'-TCTATTTTTGCAAACCATACCACTCATGG-3'	39		
	R	5'-GTATCCAAGTCTTTTACGAGGTCGATT-3'			

\*Yön; R- Reverse, F- Forward

\*\*Kyn; Kaynak

#### 4. BULGULAR

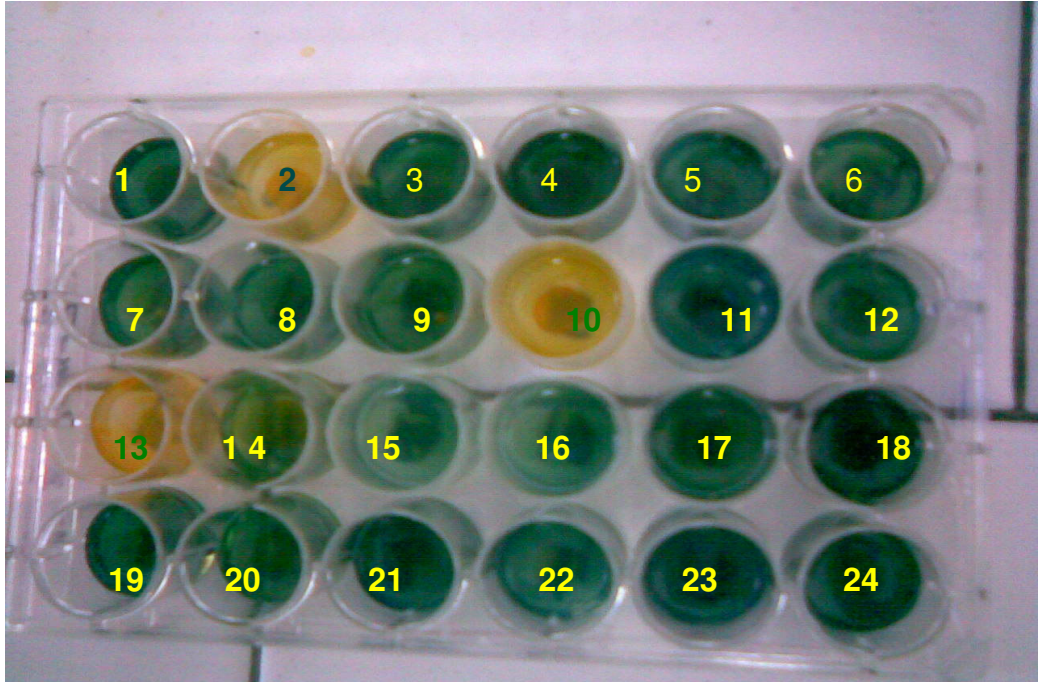
Marmara Üniversitesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda anaerob kültürlerden üretilip stoklanmış 66 BFG bakteri çalışmaya alınmıştır. Hastaların servislere göre dağılımı irdelendiğinde, bakterilerin 30'u (%45) dahili bilimler, 29'u (%44) cerrahi bilimler, 7'si (%11) yoğun bakımda takip edilenlerden izole edilmiştir. Bakterilerin çoğunu batın içi enfeksiyon etkeni oluşturmakta, bunu ikinci sıklıkla yumuşak doku enfeksiyon etkenleri izlemektedir. BFG bakterilerinin izole edildiği klinik örneklerin dağılımı Tablo 3'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.** BFG bakterilerinin izole edildiği klinik örnek türleri

Materyal türü	Toplam n (%)
Batınıçi aspirasyon sıvısı	26 (39)
Yumuşak doku	17 (26)
Kan	12 (18)
Diğer steril vücut sıvısı	10 (15)
Bronkoalveolar Lavaj (Korunmuş fırça tekniği ile)	1 (2)
Toplam	66 (100)

Gram negatif pleomorfik, basil veya kokobasil görümlü olan ve kanamisin, vankomisin, kolistine dirençli kökenlerin, klasik karbonhidrat testleri (modifiye Lombard-Dowell besiyeri-Resim 3), katalaz ve indol reaksiyonları değerlendirilerek tür düzeyinde tanımlanmaları yapılmıştır. Tablo 4a ve 4b'de klasik yöntem ile bakterilerin kullandığı karbonhidratlar, indol ve katalaz üretme reaksiyonları verilmiştir.

Klasik karbonhidrat testi ile kökenlerin 48'i *B. fragilis*, 10'u *B. thetaiotaomicron*, 4'ü *B. ovatus*, 2'si *B. uniformis*, birer *B. distasonis* ve *B. vulgatus* olarak tanımlanmıştır (Tablo 6).



**Resim 4:** Klasik karbonhidrat testi (Modifiye Lombard-Dowell agar)

Trehaloz içeren 2, 10 ve 13 numaralı kuyucuklarda karbonhidrat fermentasyonu oluşmuş iken diğer kuyucuklarda oluşmamıştır. Trehaloz, *B. thetaiotaomicron*'da pozitif iken *B. fragilis*'te negatiftir.

**Tablo 4a.** Klasik yöntemlerle; katalaz, indol oluşturma ve karbonhidratları kullanma reaksiyonlarına göre BFG bakterilerin tanımlanması

Kökenler	Arabinoz	Ramnoz	Ksilan	Salisin	Sellobiyoz	Trehaloz	Katalaz	İndol	Tür
D1	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D3	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D4	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D5	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D6	+	-	-	-	+	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D7	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D11	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D12	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D13	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D15	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D16	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D18	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D19	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D22	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D23	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D24	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D25	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D26	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>B. vulgatus</i>
D27	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D28	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D30	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D31	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D32	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>B. thetaiotaomicron</i>
D33	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D35	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>B. thetaiotaomicron</i>
D36	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D37	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D38	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. thetaiotaomicron</i>
D39	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D40	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D41	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D43	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D44	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>B. thetaiotaomicron</i>
D49	+	-	+	+	+	-	-	+	<i>B. uniformis</i>
D52	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>B. thetaiotaomicron</i>
D56	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>B. thetaiotaomicron</i>
D58	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>B. distasonis</i>
D61	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D62	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D63	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. ovatus</i>

**Tablo 4b.** Klasik yöntemlerle; katalaz, indol oluşturma ve karbonhidratları kullanma reaksiyonlarına göre BFG bakterilerin tanımlanması

Kökenler	Arabinoz	Ramnoz	Ksilan	Salisin	Sellobiyoz	Trehaloz	Katalaz	İndol	Tür
D64	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>B. thetaiotaomicron</i>
D65	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D66	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. ovatus</i>
D68	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D70	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. ovatus</i>
D71	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D73	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D74	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D75	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D78	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>B. thetaiotaomicron</i>
D83	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D84	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D85	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>B. thetaiotaomicron</i>
D89	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D90	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D91	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. ovatus</i>
D92	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>B. uniformis</i>
D94	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D96	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D98	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D99	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D100	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D101	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>B. thetaiotaomicron</i>
D102	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>B. fragilis</i>
D103	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>B. fragilis</i>

Bakterilerin tür tayini, aynı zamanda rapid ID 32 A (bioMérieux-France) ile de yapılmıştır. Klasik karbonhidrat testi ile rapid ID 32 A (bioMérieux-France) karşılaştırıldığında, her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar %100 oranında uyumlu bulunmuştur. Altı kökende rapid ID 32 A (bioMérieux-France) ile *B. uniformis* veya *B. ovatus* ayrımı yapılamazken; katalaz testi ve klasik karbohidrat yöntemiyle bakteriler arasında ayırım yapılabilmektedir. Tablo 5'te her iki yöntemle göre bu bakterilerin tanımlanmaları verilmiştir.

**Tablo 5.** Rapid ID 32 A (bioMérieux- France) ile klasik yöntemlerin *B.uniformis/ovatus*'u tanımlaması

Kökenler	Rapid ID32 A	Klasik yöntemler ile
D49	<i>B. uniformis/ovatus</i>	<i>B. uniformis</i>
D63	<i>B. uniformis/ovatus</i>	<i>B. ovatus</i>
D66	<i>B. uniformis/ovatus</i>	<i>B. ovatus</i>
D70	<i>B. uniformis/ovatus</i>	<i>B. ovatus</i>
D91	<i>B. uniformis/ovatus</i>	<i>B. ovatus</i>
D92	<i>B. uniformis/ovatus</i>	<i>B. uniformis</i>

Rapid ID 32 A (bioMérieux- France) ile 66 BFG bakterinin; 48'i (%73) *B. fragilis*, 10'u (%15) *B. thetaiotaomicron*, 6'sı (% 9) *B. uniformis/ ovatus* ve 1'er suşu *B. distasonis* (%1.5) ve *B. vulgatus* (%1.5) olarak tanımlanmıştır. Türlerin örnek sayılarına göre dağılımı Tablo 6'da verilmiştir.

**Tablo 6.** Örnek sayılarına göre BFG bakterilerin tür dağılımı

BFG bakteri türü	Klinik örnek sayısı n(%)
<i>B. fragilis</i>	48(73)
<i>B. thetaiotaomicron</i>	10(15)
<i>B. uniformis/ ovatus</i>	6(9)
<i>B. distasonis</i>	1(1,5)
<i>B. vulgatus</i>	1(1,5)
Toplam	66(100)

Kökenlerin hiçbirinde metronidazol direnci saptanmazken, 4 köken (%6) imipeneme ve 5 köken (%8) meropeneme dirençli bulunmuştur. Üç kökeninde (%5) meropeneme orta derecede duyarlılık gösterdiği saptanmıştır. Her üç antibiyotiğe ait agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları Tablo 7a ve 7b'de belirtilmiştir.

**Tablo 7a.** İmipenem, meropenem ve metronidazol ile yapılan agar dilüsyon yönteminde saptanan MİK değerleri

<b>Kökenler (n:66)</b>	<b>İmipenem MİK (µg/ml)</b>	<b>Meropenem MİK(µg/ml)</b>	<b>Metronidazol MİK(µg/ml)</b>
D1	0.5	4	1
D3	0.25	4	0.5
D4	0.25	2	0.5
D5	32	32	0.5
D6	0.5	4	0.5
D7	0.5	4	0.5
D11	0.5	0.125	0.5
D12	0.06	0.06	0.25
D13	0.25	0.06	0.5
D15	2	8	0.5
D16	0.5	4	0.5
D18	0.5	0.25	0.5
D19	0.06	0.06	2
D22	0.125	0.125	0.5
D23	0.25	0.125	1
D24	0.5	2	1
D25	0.06	0.125	0.5
D26	0.25	0.125	1
D27	0.125	0.125	1
D28	0.125	0.125	1
D30	0.125	0.06	1
D31	0.5	8	1
D32	0.25	0.25	1
D33	0.25	4	0.5
D35	0.06	0.125	0.5
D36	0.5	4	0.25
D37	0.5	8	1
D38	0.25	0.25	2
D39	0.25	2	0.5
D40	0.5	2	1
D41	16	64	0.5
D43	0.125	4	2
D44	0.5	0.25	0.5
D49	0.25	0.25	2
D52	1	0.5	1
D56	0.25	0.06	1

**Tablo 7b.** İmipenem, meropenem ve metronidazol ile yapılan agarda dilüsyon yönteminde saptanan MİK değerleri

Kökenler (n:66)	İmipenem MİK (µg/ml)	Meropenem MİK(µg/ml)	Metronidazol MİK(µg/ml)
D58	2	1	1
D61	2	0.125	2
D62	0.25	4	0.5
D63	0.125	0.06	2
D64	0.25	0.5	0.5
D65	0.25	0.125	2
D66	0.06	0.06	1
D68	0.125	0.125	0.5
D69	0.125	0.25	0.5
D70	0.25	0.125	2
D71	1	4	0.5
D73	0.06	0.125	0.5
D74	0.06	0.06	0.5
D75	0.25	2	1
D78	0.125	0.125	1
D83	16	64	1
D84	0.125	0.03	1
D85	<0.03	0.125	2
D89	16	32	1
D90	0.06	0.125	0.5
D91	0.125	0.25	1
D92	0.25	0.25	1
D94	0.06	0.125	0.5
D96	0.5	16	1
D98	0.25	0.25	0.5
D99	2	4	1
D100	0.125	0.06	2
D101	0.5	0.5	1
D102	0.25	4	0.5
D103	0.125	0.06	0.5
ATCC BF*	0.03	0.03	0.5
ATCC BT**	0.125	0.25	2

\* *B. fragilis* ATCC 25285

\*\* *B.thetaiotaomicron* ATCC 29741

Türlere göre imipenem ve meropenem duyarlılıkları incelendiğinde imipeneme dirençli 4 köken ile meropeneme dirençli 5 kökenin ( orta düzeyde dirençli olan 3 kökende eklendiğinde 8 kökenin) *B. fragilis* olduğu görülmüştür. ( Tablo 8)

**Tablo 8.** BFG bakterilerde türlerin imipenem ve meropenem duyarlılıkları

BFG Türleri (n)	IMP'e* Duyarlı n (%)	IMP'e Dirençli n (%)	MEM'e** Duyarlı n (%)	MEM'e Orta Dirençli n (%)	MEM'e Dirençli n (%)
<i>B. distasonis</i> (1)	1 ( 100)	0 (0)	1 ( 100)	0 (0)	0 (0)
<i>B. fragilis</i> (48)	44 (92)	4 (8)	40 (83)	3 (6)	5 (11)
<i>B. thetaiotaomicron</i> (10)	10(100)	0 (0)	10(100)	0 (0)	0 (0)
<i>B. uniformis/ovatus</i> (6)	6 (100)	0(0)	6 (100)	0 (0)	0(0)
<i>B. vulgaris</i> (1)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)

\*IMP, İmipenem

\*\*MEM, Meropenem

MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri imipenem için 0.25 µg/ml ile 2 µg/ml, meropenem için 0.25 µg/ml ile 8 µg/ml, metronidazol için 1 µg/ml olarak saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları ile MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri Tablo 9'da gösterilmiştir.

**Tablo 9.** BFG bakterilerin antibiyotiklerin duyarlılık sonuçları ve MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> değerleri

	Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları (n:66)				
	Duyarlı n (%)	Orta Dirençli n (%)	Dirençli n (%)	MİK <sub>50</sub> (µg/ml)	MİK <sub>90</sub> (µg/ml)
İmipenem	62 (94)	- (0)	4 (6)	0.25	2
Meropenem	58 (88)	3 (4)	5 (8)	0.25	8
Metronidazol	66 (100)	- (0)	- (0)	1	1

Aynı zamanda imipenem, meropenem ve metronidazolün MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri *B. fragilis* ile *fragilis*-dışı BFG bakteriler olarak 2 grupta irdelendiğinde, *B. fragilis* kökenlerinde karbapenemlere direnç oranının yaklaşık %10 civarında olduğu saptanmıştır. Sonuçlar Tablo 10'da belirtilmiştir.

**Tablo 10.** *B. fragilis* ve *B. fragilis*-dışı BFG bakterilerin karbapenem ve metronidazol için MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri

	<i>B. fragilis</i> (n:48)			Fragilis-dışı BFG (n:18)		
	MİK <sub>50</sub> (µg/ml)	MİK <sub>90</sub> ((µg/ml)	Direnç(%)	MİK <sub>50</sub> (µg/ml)	MİK <sub>90</sub> (µg/ml)	Direnç(%)
Metronidazol	0.5	1	0	1	2	0
İmipenem	0.25	2	8	0.25	0.25	0
Meropenem	2	32	10	0.25	0.5	0

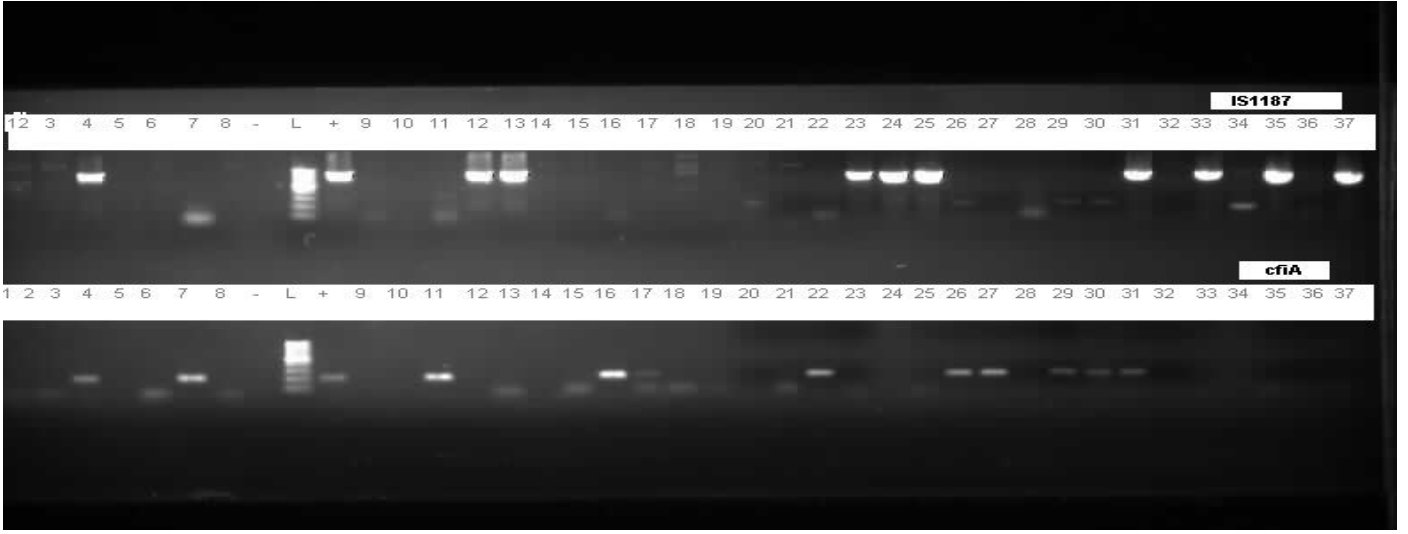
Karbapenemlere direnç durumu irdelendiğinde, 4 köken hem imipeneme hem de meropeneme dirençli, 1 kökenin ise imipeneme duyarlı, meropeneme dirençli olduğu bulunmuştur. Dirençli tüm kökenler *B. fragilis*'tir. Dirençli kökenler, türleri ve MİK değerleri Tablo 11'de gösterilmiştir.

**Tablo 11.** Karbapeneme dirençli kökenlerde tür ve MİK değerleri

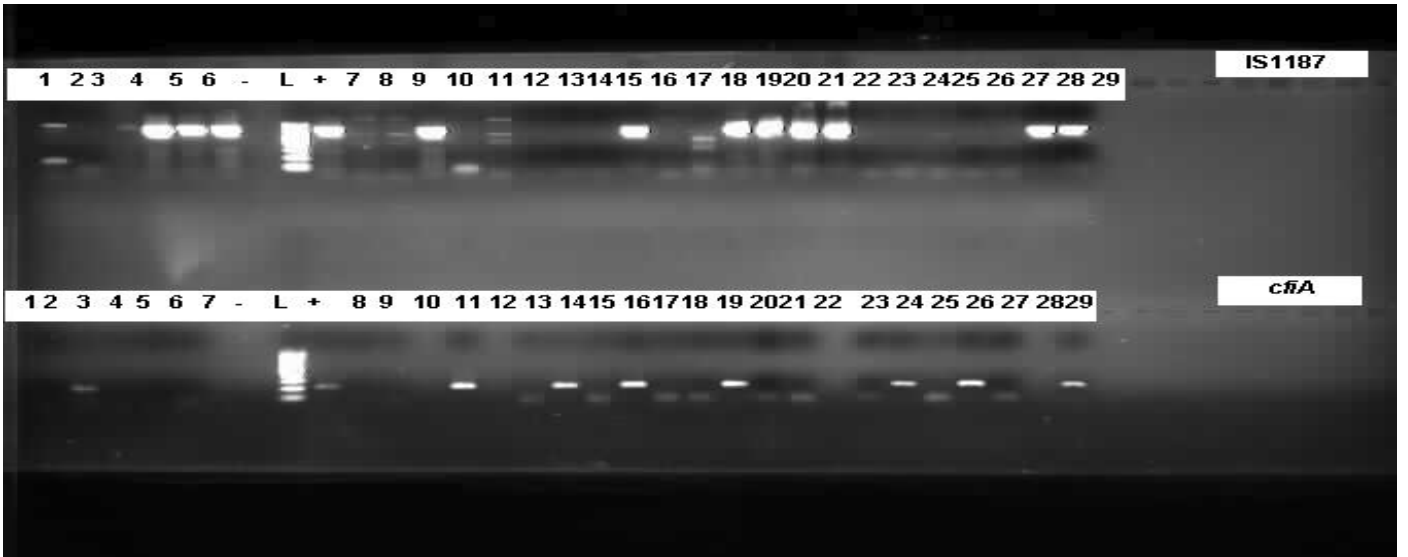
Kökenler		İmipenem MİK(µg/ml)	Meropenem MİK(µg/ml)
D5	<i>B. fragilis</i>	32	32
D41	<i>B. fragilis</i>	16	64
D83	<i>B. fragilis</i>	16	64
D89	<i>B. fragilis</i>	16	32
D96	<i>B. fragilis</i>	0.5	16

PZR çalışmasında karbapenem ve metronidazol direncinden sorumlu tutulan *cfiA* ve *nim* genleri ile her iki direnç geniyle ilişkili IS (Insertion sequences) elementi araştırılmıştır.

Kökenlerin hiçbirinde *nim* genine rastlanmamıştır. Atmış altı kökenin 18'inde (%27) *cfiA* geni saptanmış ve *cfiA* geni pozitif kökenlerin tamamının *B. fragilis* olduğu görülmüştür (Resim 5–6).



Resim 5. *cfiA* ve IS1187



Resim 6. *cfiA* ve IS1187



ve IS1187 ile IS4351 pozitif olan kökenlerin, türleri, karbapenem MİK değerleri verilmiştir.

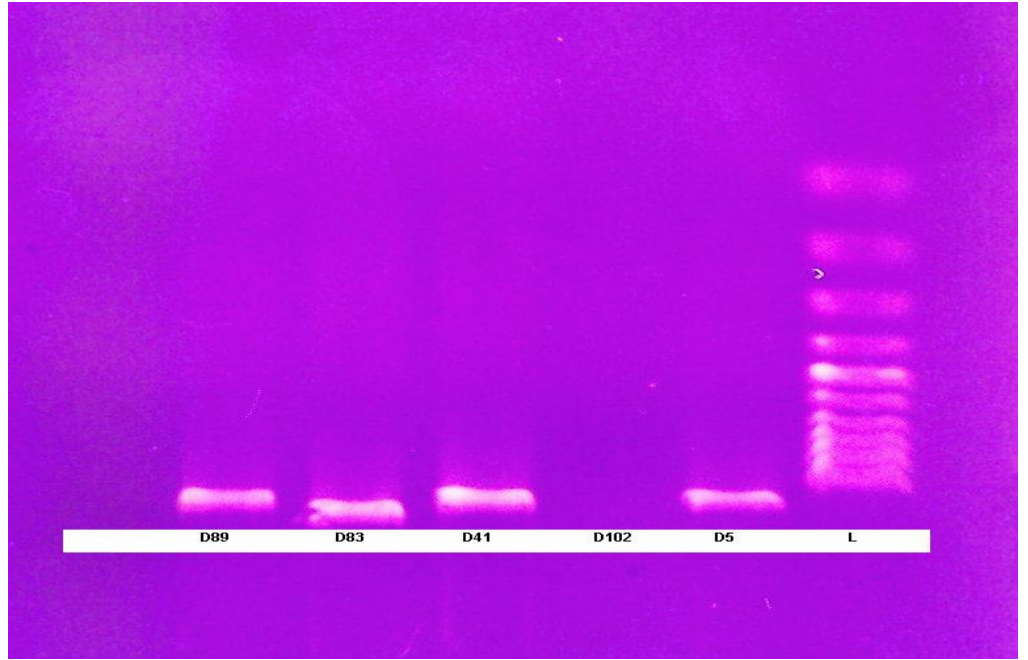
**Tablo 12.** *cfiA* geni ,IS1187 ile IS4351 pozitif kökenler ve MİK değerleri

Kökenler	İmipenem MİK(µg/ml)	Meropenem MİK(µg/ml)	<i>cfiA</i>	IS 1187	IS 4351	
<b>D5</b>	<b><i>B. fragilis</i></b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
D11	<i>B. fragilis</i>	0.5	0.125	+	-	-
D16	<i>B. fragilis</i>	0.5	4	+	-	-
D18	<i>B. fragilis</i>	0.5	0.25	-	+	-
D19	<i>B. fragilis</i>	0.06	0.06	-	+	-
D24	<i>B. fragilis</i>	0.5	2	+	-	-
D28	<i>B. fragilis</i>	0.125	0.125	+	-	-
D31	<i>B. fragilis</i>	0.5	8	+	-	-
D32	<i>B. thetaiotaomicron</i>	0.25	0.25	-	+	-
D33	<i>B. fragilis</i>	0.25	4	-	+	-
D35	<i>B. thetaiotaomicron</i>	0.06	0.125	-	+	-
D36	<i>B. fragilis</i>	0.5	4	+	-	-
D37	<i>B. fragilis</i>	0.5	8	+	-	-
D39	<i>B. fragilis</i>	0.25	2	+	-	-
D40	<i>B. fragilis</i>	0.5	2	+	-	-
<b>D41</b>	<b><i>B. fragilis</i></b>	<b>16</b>	<b>64</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
D44	<i>B. thetaiotaomicron</i>	0.5	0.25	-	+	+
D52	<i>B. thetaiotaomicron</i>	1	0.5	-	+	-
D58	<i>B. distasonis</i>	2	1	-	+	-
D62	<i>B. fragilis</i>	0.25	4	+	-	-
D63	<i>B. ovatus</i>	0.125	0.06	-	+	-
D64	<i>B. thetaiotaomicron</i>	0.25	0.5	-	+	-
D65	<i>B. fragilis</i>	0.25	0.125	-	+	-
D66	<i>B. ovatus</i>	0.06	0.06	-	+	-
D70	<i>B. ovatus</i>	0.25	0.125	-	+	-
D71	<i>B. fragilis</i>	1	4	+	-	-
D75	<i>B. fragilis</i>	0.25	2	+	-	-
<b>D83</b>	<b><i>B. fragilis</i></b>	<b>16</b>	<b>64</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>D89</b>	<b><i>B. fragilis</i></b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
D90	<i>B. fragilis</i>	0.0625	0.125	-	+	-
D91	<i>B. ovatus</i>	0.125	0.25	-	+	+
D92	<i>B. uniformis</i>	0.25	0.25	-	+	+
D96	<i>B. fragilis</i>	0.5	16	+	-	-
<b>D102</b>	<b><i>B. fragilis</i></b>	<b>0.25</b>	<b>4</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>

\* Koyu renkle *cfiA* ve IS1187 pozitif kökenler belirtilmiştir.

Hem *cfiA* hemde IS1187'inin beraber bulunmasının karbapeneme direnç gelişimindeki etkisi incelendiğinde, her iki parametrenin beraber bulunduğu 5 kökenden 4'ü (%80) karbapenemlerden herhangi birine direnç gösterirken, bir köken duyarlı bulunmuştur. Pearson  $\chi^2$  ile p değeri  $p < 0.001$  olarak saptanmış ve anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

*cfiA* ile IS1187'nin beraber olduğu kökenlerde IS elementinin *cfiA* geni önünde yer alıp almadığını saptamak amacıyla *cfiA*-3 reverse primeri ile IS1187 forward primerleri kullanılarak PZR yapıldı. PZR deneyinde, bu kökende herhangi bir bant görülmez iken diğer *cfiA* ve IS1187 pozitif karbapenemlere dirençli kökenlerde PZR ürünü elde edilmiştir (Resim 7).



**Resim 7.** Önünde IS1187'nin yer aldığı *cfiA* pozitif kökenler

Karbapenem duyarlılıkları kıyaslandığında, meropenemin MİK değerleri imipenemin MİK değerlerine göre daha yüksek seyretmektedir. Tablo 13'de *cfiA* pozitif ve negatif *B.fragilis* kökenlerinin MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri ile farklı dilüsyonlardaki MİK değerine sahip kökenlerin oranları verilmiştir. Tablo 14'te ise *cfiA* geni ve IS1187'nin beraber bulunma, *cfiA*

pozitif ama IS1187 negatif kökenler ile *cfiA* ve IS1187 negatif kökenlerin karbapenemlere karşı MİK dağılımının karşılaştırılmıştır.

**Tablo 13:** *cfiA* varlığına göre *B.fragilis* kökenlerinin MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri

<i>B.fragilis</i>	İmipenem		Meropenem	
	MİK <sub>50</sub> (µg/ml)	MİK <sub>90</sub> ((µg/ml)	MİK <sub>50</sub> (µg/ml)	MİK <sub>90</sub> (µg/ml)
<i>cfiA</i> + (n:18)	0.5	16	4	64
<i>cfiA</i> – (n:30)	0.125	2	0.125	4

**Tablo 14.** *cfiA* geni ve IS1187 pozitifliklerine göre kökenlerin karbapenemlere karşı MİK dağılımının karşılaştırılması

	MİK (µg/ml) değerlerinin dağılım sayıları									
	≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
İmipenem										
<i>cfiA</i> ( +), IS1187(+)(n:5)	-	1	-	-	-	-	-	3	1	-
<i>cfiA</i> ( +), IS1187(-)(n:18)	1	3	7	1	-	-	-	-	-	-
<i>cfiA</i> (-), IS1187(-)(n:43)	22	15	7	1	4	-	-	-	-	-
Meropenem										
<i>cfiA</i> ( +), IS1187(+)(n:5)	-	-	-	-	-	1	-	-	2	2
<i>cfiA</i> ( +), IS1187(-)(n:18)	2	-	-	-	4	4	2	-	-	-
<i>cfiA</i> (-), IS1187(-)(n:61)	26	9	4	1	-	7	1	1	-	-

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Anaerop bakteriler insan ve hayvan patojenleri arasında önemli yere sahip, ciddi hatta fatal seyirli enfeksiyonlara neden olabilen mikroorganizmalardır (1). Anaeroplara 1970'lerin başından beri antibiyotiklere artan oranda direnç gösterdikleri, direncin *Bacteroides* türleri, özellikle BFG bakterileri arasında fazla görüldüğü bildirilmektedir. Antibiyotiklere direnci kodlayan genlerin büyük bir bölümünün plazmid veya tranpozonlar üzerinde yer alması, bir bakteriden diğerine kolayca aktarılabilmesi ve BFG bakterilerin, sıklıkla izole edilen patojenlerden olması tehlikenin büyüklüğünü gözler önüne sermektedir. Bu sebeplerden dolayı anaerop bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması, tedavi yönünden büyük önem taşımaktadır (3, 4).

*Bacteroides fragilis* grubu bakteriler çoğunlukla diyafram altı enfeksiyonlarından; batın içi absesi, karaciğer absesi ve diyabetik ayak enfeksiyonlarından izole edilmekte ve bakteriyemiye neden olmaktadır. Kolon florasının önemli bir bölümünü oluşturan BFG bakterilerinden *Bacteroides fragilis*, anaerop enfeksiyonlarda birinci sırayı almakta bunu *Bacteroides thetaiotaomicron* izlemekte daha az sıklıkla ise *B. distasonis*, *B. caccae*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*, *B. merdae*, *B. ovatus*, *B. eggerthii*, *B. variabilis*, *B. stercoralis* izole edilmektedir (41). Çalışmamızda 12'si bakteriyemi etkeni, 26'sı batın içi, 17'si yumuşak doku enfeksiyonlarından, diğerleri normalde steril vücut bölgelerinden izole edilmiş toplam 66 kökenin rapid ID 32 A (bioMérieux- France) ile yapılan tanımlamasında, 48'i (%73) *B. fragilis*, 10'u (%15) *B. thetaiotaomicron* diğerleri ise *B. uniformis/ ovatus* (n:6), *B. distasonis* ve *B. vulgatus* olarak isimlendirilmiştir (Tablo 4).

Yarı otomatize sistem rapid ID 32 A (bioMérieux- France)'in yanısıra Whaley ve ark. (38) geliştirdikleri Lombard-Dowell besiyeri laboratuvarımız koşullarına uyarlanarak, bakterilerin karbohidratları kullanma özellikleri araştırılmıştır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada

besiyelerini plaklara dökmüş, birkaç kökeni aynı plağa ekerek ortamda bulunan indikatör ile bakterinin metabolizma ürünlerini tespit etmişlerdir. Aynı yöntemle farklı şekerler ekleyerek hazırladığımız besiyerine birden fazla örnek ektiğimizde reaksiyonların birbirini örttüğünü gördük, bunun üzerine herbir bakterinin reaksiyonunu tam olarak ölçebilmek için besiyelerini hücre kültürleri için kullanılan 24 kuyucuklu steril plaklara döküp herbir bakteriyi bir kuyucuğa ekerek karbohidratları kullanma özelliklerini inceledik (Resim 1). Karbonhidrat testlerimiz rapid ID 32 A (bioMérieux- France) ile %91 oranında uyumlu sonuç vermiştir, test sonuçlarımız katalaz aktivitesi ile desteklendiğinde, rapid ID 32 A (bioMérieux- France)'nın *B. uniformis/ ovatus* şeklinde sonuçlandırdığı kökenleri ayırd edebilmiştir (Tablo 5). Laboratuvarımıza uyarladığımız bu karbohidrat testi özellikle çok sayıda kökenin çalışılması gereken durumlarda maliyeti düşük olduğu için yararlı olmaktadır. Ancak 48 saatlik inkübasyonu gerektirdiği için, hayati organları tutan enfeksiyonlarda hızlı tanımlama gerektiğinden, dört saat içinde sonuç veren rapid ID 32 A'nın kullanılması gereklidir.

Bu çalışmada hastanemizdeki BFG bakterilerinin karbapenemlere ve metronidazole direnç durumları ve direncin genetik temeli araştırılmıştır. CLSI'nin önerilerine göre yapılan agarda dilüsyon yöntemiyle kökenlerin 4'ü (%6) hem imipeneme (16–32µg/ml) hem de meropeneme dirençli (16–64µg/ml), 1(%2) köken imipeneme duyarlı, meropeneme dirençli bulunmuştur (21). Dirençli kökenlerin tamamı *B.fragilis* olup diğer BFG türlerinde direnç görülmemiştir. Dünya ülkelerinden bazılarının verileriyle kıyasladığımızda, karbapenemlere direnç oranlarımız bir hayli yüksek görülmektedir. A.B.D ve Kanada'da karbapenem direnci yıllar içinde stabil şekilde %0.2-1'lerde seyretmiş, Avrupa ülkelerinde az ancak giderek artan oranda (1989'da %0.3 iken 2000 yılında %0.77) direnç bildirilmiştir (42–47). Uzakdoğu ülkelerinden, Japonya'da yaklaşık % 2–4 oranında bildirilen imipeneme direnç oranında 15 yıl içinde belirgin bir değişiklik olmamıştır (48). Tayvan'da 2000–2007 yılları arasında hastane kaynaklı enfeksiyonlardan üretilen 60 *B.fragilis*'in

%7'sinde imipeneme, %12'sinde meropeneme, 30 *B. thetaiotamicron* kökeninin ise %4'ünde her iki karbapeneme de direnç saptanmıştır (49). Ülkemizdeki değerler incelendiğinde Şen ve ark. (50), Zandi ve ark. (51), Mamal Torun ve ark. (52) ve Mutlu ve ark. (53) yaptıkları araştırmalarda BFG bakterilerde imipeneme ve meropeneme direnç saptamazlarken, Erciş ve ark. (54), 29 BFG ile yaptıkları çalışmada, *B.fragilis* olmayan 1 BFG bakteride imipeneme direnç bulmuşlardır. Hastanemizde ilk imipeneme dirençli köken 1999 yılında, şuuru kapalı, yoğun bakımda yatan ve aspirasyon pnömonili, imipenem tedavisi almakta olan bir hastadan korunmuş fırça tekniğiyle alınan bronko alveolar lavaj sıvısında üretilmiştir (55). Diğer 4 karbapeneme dirençli kökenler ise 2002 yılından sonra izole edilmiştir. Uygulanan antibiyotik politikasına bağlı olarak ülkeler arasında, aynı ülkede şehirlerarasında, hatta aynı hastanede servisler arasında bile antibiyotiklere direnç oranında farklılıklar görülebilmektedir. Hastanemizde imipenemin, enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılıyor olması özellikle son yıllarda direnç oranımızdaki artışın muhtemel nedeni olabilir.

Karbapenemlere direnç geni araştırıldığında kökenlerin 18'inde (%27) ve de sadece *B. fragilis* türünde *cfiA* pozitif bulunmuştur. Karbapenemlerden en az birine dirençli olan 5 kökenin beşinde *cfiA* geni saptanmış, *cfiA* varlığı ile karbapeneme direnç arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Kökenlerimizde *cfiA* pozitifliğinde yıllara göre bir artış gözlenmektedir. Her ne kadar bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 2002'den sonra *cfiA* pozitifliği %30, daha önceki yıllarda ise %20 bulunmuştur. Ülkemizde BFG bakterilerinde antibiyotiklere direnç genlerini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dünya verilerini incelediğimizde, karbapenemlere dirençli olmayıp, ancak yüksek MIK değerlerine sahip kökenlerde, özellikle *B.fragilis* türlerinde yaklaşık %2–7 oranında *cfiA* pozitifliği bildirilmiştir (37,39).

Yüksek düzeyde karbapenemlere direnç gösteren *Bacteroides*'lerde *cfiA*'geninin hemen önünde yer alan ve bu direnç genini aktifleyen IS elementleri tespit edilmiştir ve yüksek düzey karbapenem direnci olan bakteriler %1'den daha az oranda bildirilmiştir. *cfiA* geni kromozom içinde bulunurken, IS elementleri hareketlidir. Avrupa'nın 19 ülkesinde toplanan 1284 BFG kökenlerinde elde edilen ve imipenem MIK değeri 1 'den büyük olan 65 köken çalışılmış, *cfiA* ile birlikte bulunan 6 farklı IS elementi tanımlanmıştır. Bunlar; IS613, IS614, IS1169, IS1186, IS1187, IS4351 olup, belli IS elementleri belli ülkelerde daha fazla yoğunlaşmıştır (39, 46). Çalışmamızda bu IS elementlerinin primerlerini kullanarak kökenlerimizde IS varlığını araştırdık. Kökenlerimizin 21'inde (11'i *B.fragilis*, 10'u *B.fragilis*-dışı BFG kökenlerinde) IS1187, 3'ünde IS4351 elementi saptanmış, diğer IS elementlerine rastlanmamıştır. Aynı IS elementlerinin bulunduğu ülkelere baktığımızda IS1187 Fransa'dan, IS4351 elementinin Çek Cumhuriyeti'nden gelen *B.fragilis* kökenlerinde bulunduğu görülmüştür.

Kökenlerimizde IS elementi ve *cfiA* geni beraberliğini irdelediğimizde 5 kökende IS elementi ve *cfiA* geninin ikisi saptanmıştır. Bunlardan 4'ü hem imipeneme hem de meropeneme dirençli bulunmuştur. Diğer *cfiA* geni ve IS 1187 elementi pozitif olan ancak karbapenemlere duyarlı kökenin (D102) imipenem MIK değeri 0.25 µg/ml, meropenem MIK değeri ise 4µg/ml bulunmuştur. Direnç geni ve IS elementi aynı kökende olduğu halde karbapenemlere direnç göstermemesi (direnç sınırında olmamakla beraber meropenem MIK değeri yüksek bulunmuştur) IS'nın hemen *cfiA*'nın önünde yer almamış olabileceğini dolayısıyla direnç geninin IS tarafından aktive edilmediği düşündürmüştür. Nitekim IS elementinin *cfiA*'nın hemen önünde yer alıp almadığını araştırmak için; IS1187'nin *forward* primerini, *cfiA*'nın ise *reverse* primerini kullanarak yaptığımız PZR deneyinde, bu kökende herhangi bir bant görülmez iken diğer *cfiA* ve IS1187 pozitif karbapenemlere dirençli kökenlerde PZR ürünü elde edilmiştir.(Resim 4). Zaman içinde hareket etme özelliğine

sahip olan IS elementinin *cfiA*'nın önüne gelerek sessiz geni aktive edebileceği, bakteriyi dirençli hale getirebileceği varsayımı yapılabilir.

*Bacteroides fragilis* kökenlerinden, herhangi bir IS elementi bulunmayan, *cfiA* geni pozitif olan D96'ın imipenem MİK değeri 0,5, meropenem MİK değeri ise 16 µg/ml bulunmuştur. Muhtemelen IS elementi yokluğuna bağlı düşük düzey karbapenem direnci bu bakteride hareketli bir IS elementi geldiğinde yüksek düzey direnç şeklinde ifade edilecektir. Yaklaşık kökenlerimizin üçte birinde IS elementi bulunması bu olasılığın çok yüksek olduğunu göstermektedir. Sadece *B.fragilis* kökenlerinde *cfiA*'nın bulunması göz önüne alınırsa, diğer BFG bakterilerde karbapenemlere direnç gelişme riski zayıf gibi gözükmemektedir ancak bu bakterilerin de IS elementlerine sahip olması, *B. fragilis* kökenlerine, özellikle sessiz *cfiA* geni taşıyanlara IS elementlerini aktararak onların dirençli hale gelmesine neden olabileceklerdir.

Yapılan çalışmalarda meropenem MİK değerleri imipenem MİK değerlerine göre 2 veya 4 kat daha yüksek bulunmuştur (37). Sonuçlarımız irdelendiğinde iki köken imipeneme duyarlı olduğu halde, bu kökenlerin birinde (D96) meropeneme direnç, diğerinde (D102) ise meropeneme duyarlılık sınırında ancak yüksek MİK değeri (4µg/ml) elde edilmiştir. Diğer yandan *B. fragilis* kökenlerinden *cfiA* geni olanlar ile olmayanların meropenem MİK değerleri kıyaslandığında, *cfiA* genine sahip olanların MİK<sub>50</sub> değeri 4µg/ml iken olmayanların MİK<sub>90</sub> değeri 4µg/ml bulunmuştur (Tablo 13). Meropenem ile imipenem MİK değerlerindeki farklılık bize bakterilerin duyarlılıklarını takip etmede yol gösterici olabilir. Örneğin sonuçlarımıza bakılarak *B. fragilis* kökenlerinde meropenem MİK değerleri 4 µg/ml ve üzerinde olanların, *cfiA* bulundurma olasılığının yüksek olduğu varsayımında bulunabiliriz. Laboratuvarımız koşullarında yüksek MİK değerine sahip kökenleri daha kolay saptayacağımız ve bu kökenleri daha yakından izleyeceğimiz yöntemler geliştirmemiz gerektiği kanısındayız. Bu amaçla meropenem E-test ya da tarama amaçlı 4 µg/ml meropenem bulunduran besiyerleri kullanılabilir veya kökenlerin diğer

karbapenemlerden ertapeneme duyarlılıkları test edilerek elde edilen sonuçlarla bir bağlantının olup olmadığı araştırılabilir.

Çalışmamızda kökenlerimizin metronidazole duyarlılık durumları da araştırılmıştır. CLSI'nin '8 µg/ml ve altındaki değerler duyarlı, 16 µg/ml orta dirençli, 32 µg/ml ve üzerindeki değerler dirençli' ölçütlerine göre değerlendirilen kökenlerin tamamı metronidazole duyarlı,  $MiK_{50}$  ve  $MiK_{90}$  değerleri 1 µg/ml olarak bulunmuştur. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalar dan bulunduğumuz ilde, İstanbul Üniversitesi'nin iki ayrı fakültesinde; BFG bakterilerinin metronidazol direnci İstanbul Tıp Fakültesi'nde % 6, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde % 4 olarak, diğer illerde farklı hastanelerden ise %0-14 arasında bildirilmiştir (50-54). Dünya ülkelerinin değerleri ise %1'in altında seyretmektedir (42-49).

Metronidazole direnç oluşumundan sorumlu *nimA-G* direnç genleri saptanmıştır. Tüm *Bacteroides* kökenlerinde görülebilen, plazmidlerde veya kromozomda hareketli DNA parçaları üzerinde yer alan, bir bakteriden diğerine aktarılabilen, yaklaşık %70 oranında gen benzerliği taşıyan *nim* genleri önlerine gelen özgün IS elementleri ile aktive olmaktadır. Son zamanlarda tanımlanan *nimE*, *F* ve *G* ile yeterli bilgi olmamakla beraber *nimA*, *nimC* ve *nimD*'nin farklı plazmidler üzerinde, *nimB*'nin ise kromozom da buldukları saptanmıştır. *nimA* ve *nimB*'nin IS1186, *nimC*'nin IS1170, *nimD*'nin ise IS1169 ile aktive olduğu anlaşılmıştır (32, 35, 36). Bu IS elementlerin bazılarının aynı zamanda *cfiA* genini de aktive ettiği gözönüne alınırsa ileride direncin boyutlarının tahmin edilenden daha büyük olacağı söylenebilir. Kökenlerimizde PZR ile metronidazol direncinden sorumlu *nim* direnç genlerine rastlanmamıştır. Çalışmamızda metronidazole direncin görülmemesi, direnç geninin olmaması bu antibiyotiklerin kullanımında risk altında olmadığımız izlenimini vermekle beraber, BFG kökenlerimizin yaklaşık üçte birinde IS elementlerinin bulunması, ileride herhangi bir şekilde direncin başlaması

halinde hızlı yayılım gösterebileceği ve yüksek oranda seyredeceğini düşündürmektedir.

Anaerop enfeksiyonların yaygın olarak görülmesi, mortalite ve morbitide oranlarının yüksek seyretmesi, klinik ipuçlarının çok özel olmaması, tedavinin bakterinin türüne göre değişiyor olması, son yıllarda artan oranda direnç varlığının bildirilmesi etken mikroorganizmanın tanımlanmasını ve antibiyotik direncinin bilinmesini gerekli kılmaktadır. Anaerop enfeksiyonlardan en sık izole edilen BFG bakteriler üzerine etkili olan karbapenem ve metronidazole direnç varlığı dünyanın çeşitli ülkelerinden bildirilmiş, direnci kodlayan genler tanımlanmıştır. Hareketli DNA parçaları üzerinde yer alan, bir bakteriden diğerine aktarılabilen bu direnç genlerinin gelecekte önemli direnç problemi yapacağı varsayımı öne sürülmektedir. Çalışmamızda, hastanemizde izole edilen BFG bakterilerinin metronidazol ve karbapeneme direnç durumu ve direnç genleri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz, direnç genleri (*nim* ve *cfiA*) ve IS elementleri ile ilgili veriler gerek hastanemiz gerekse henüz bu konuda moleküler verilerin bulunmadığı ülkemizde bir veri tabanı oluşturacaktır. *cfiA* geni ve IS elementi taşıyan kökenlerimizin fazla olması, aynı IS elementlerinin karbapenem ve metronidazole direnç genlerini aktifliyeabilmesi, ileride direnç genleri ile IS elementlerinin biraraya gelip direnç oluşturma olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum, belirli aralıklarla ve düzenli olarak antimikrobiyallere direnç durumunun saptanmasını, dirençten sorumlu gen ve IS elementlerinin araştırılmasını gerekli kılmaktadır.

## 6.KAYNAKLAR

1. Finegold SM. Anaerobic bacteria: general concepts. Ed: Mandell LG, Bennett JE, Dolin R, Principles and Practise of Infectious Diseases. 5th Edition, pp.2519–2575, Churchill Livingstone, Philadelphia, USA, 2005.
2. Shah HN, Gharbia SE, Duerden BI. *Bacteroides*, *Prevotella* and *Porphyromonas*. Ed: Collier L, Balows A, Sussman M. Topley's and Wilson's Microbiology and Microbial Infection. pp. 1305–29, Arnold,London, 1998.
3. Garcia-Rodriguez JA, Garcia-Sanchez JE, Munoz- Bellido JL. Antimicrobial resistance in anaerobic bacteria: Current situation. *Anaerobe* 1995;1:69–80.
4. Rasmussen BA, Bush K, Tally FP. Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clin Infect Dis* 1997; 24:110–20.
5. Tally FP, Cuchural GJ, Malmay MH. Mechanisms of resistance and resistance transfer in anaerobic bacteria: Factors influencing antimicrobial therapy. *Rev Infect Dis* 1984;6:260–9.
6. Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayek K, Salyers AA. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides spp.* and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:561–8.
7. Historical Aspect. Ed: Finegold SM, George WL, Mulligan ME, Anaerobic Infections. pp. 1–2, Year Book Medical Publishers, Inc, Chicago, USA,2000.
8. Gürler N. Muayene maddelerinden izole edilen *Bacteroides* cinsi bakterilerin tiplendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Tezi, İstanbul, 1986.
9. Citron DM, Poxton IR, Baron EJ. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and Other Anaerobic Gram-Negative Rods. Ed: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, Manuel of Clinical Microbiology. 9th Edition, pp.911–933, ASM Press, Washington D.C, USA, 2007.

10. Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. 6th Edition, Star Publishing Company, California, USA, 2002.
11. Duerden BI. Virulence factors in anaerobes. Clin Infect Dis 1994;18:253–259.
12. Tzianabos AO, Kasper DL, Onderdonk AB. Structure and function of *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharides: relationship to induction and prevention of abscesses. Clin Infect Dis 1995;20:132–140.
13. Linberg AA, Weintraub A, Zahringer U, Rietschel ET. Structure-activity relationships in lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*. Rev Infect Dis 1990;12:133–141.
14. Botta GA, Arzese A, Minisini R, Trani G. Role of structural and extracellular virulence factors in gram-negative anaerobic bacteria. Clin Infect Dis 1994;18:260–264.
15. Rotstein OD. Role of fibrin deposition in the pathogenesis of intraabdominal infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11:1064–1068.
16. Finlay-Jones JJ, Kenny PA, Nulsen MF, Spencer LK, Hill NL, McDonald PJ. Pathogenesis of intraabdominal abscess formation: abscess-potentiating agents and inhibition of complement-dependent opsonization of abscess-inducing bacteria. J Infect Dis 1991;164:1173–179.
17. Rotstein OD, Nasmith PE, Grinstein S. The *Bacteroides* by-product succinic acid and inhibits neutrophil respiratory burst by reducing intracellular pH. Infect Immun 1987;55:364–370.
18. McGregor JA, Lawellin D, Franco-Buff A, Todd JK. Phospholipase C activity in microorganisms associated with reproductive tract infection. Am J Obstet Gynecol 1991;164:682–686.
19. Sears CL, Myers LL, Lazenby A, Van Tassell RL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. Clin Infect Dis 1995;20:142–148.
20. The anaerobic bacteria. Ed: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Koneman's Color Atlas and

Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Edition, pp.878–944, JB Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2005.

21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, Approved Standards-7th Edition, M11-A7, CLSI, Pennsylvania, USA, 2007.
22. Hecht DW. Anaerobes: Antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe* 2006;12:115–121
23. Hecht DW. Prevalence of Antibiotic Resistance in Anaerobic Bacteria: Worrying Developments. *Clin Infect Dis* 2004;39:92–97.
24. Nord CE, Hedberg M. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in anaerobic bacteria. *Rev Infect Dis* 1990;12:231–234.
25. Torun M. M. Anaerob bakterilerde direnç mekanizmaları. 4. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı, s.105–118, İstanbul, 17–19 Mayıs 1999.
26. 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;53:213–221.
27. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin in Microbiol* 2000;3:489–495.
28. Podglajen I, Breuil J, Collatz E. Insertion of a novel DNA sequence, IS1186, upstream of the silent carbapenemase gene *cfiA*, promotes expression of carbapenem resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. *Mol Microbiol* 1994;12:105–114
29. 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;47:979–985.
30. Giamarellou H. Anaerobic infection therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2000;16:341–346.
31. Leiros HKS, Kozielski-Stuhrmann S, Kapp U, Terradot L, Leonard GA, McSweeney SM. Structural basis of 5-nitroimidazole antibiotic resistance. *J Biol Chem* 2004;279:55840–55849.

32. Soki J, Gal M, Brazier JS, Rotimi VO, Urban E, Nagy E, Duerden BI. Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazole resistance in *Bacteroides* strains. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:212–220.
33. Gal M, Brazier JS. Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:109–116.
34. Smith CJ, Tribble GD, Bayley DP. Genetic elements of *Bacteroides* species: a moving story. *Plasmid* 1998;40:2–29.
35. Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:253–1256.
36. Diniz CG, Farias LM, Carvalho MAR, Rocha ER, Smith CJ. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:100–108.
37. Soki J, Edwards R, Hedberg M, Fang H, Nagy E, Nord C.E. Examination of *cfiA*-mediated carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis* strains from a European antibiotic susceptibility survey. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:497–502.
38. Whaley DN, Wiggs LS, Miller PH, Srivastava PU, Miller JM. Use of presumptive plates to identify anaerobic bacteria. [J Clin Microbiol](#) 1995;33:1196-202.
39. Soki J, Fodor E, Hecht W. D, Edwards R, Rotimi O. V, Kerekes I, Urban E, Nagy E. Molecular characterization of imipenem resistance *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. *J Med Chem* 2004;53:413–419.
40. Podglajen I, Breuil J, Rohaut A, Monsempes C, Collatz E. Multiple mobile promoter regions for the rare carbapenem resistance gene of the *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 2001;183(11):3531–3535.
41. Lorber B. *Bacteroides, Prevotella, Porphyromonas, and Fusobacterium* Species (and Other Medically Important Anaerobic Gram-Negative Bacilli). Ed: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R,

Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th Edition, pp. 2561–2570, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000.

42. Aldridge E. K, Sanders V. C. Susceptibility trending of blood isolates of the *Bacteroides fragilis* group over a 12-year period to clindamycin, ampicillin-sulbactam, cefoxitin, imipenem, and metronidazole. *Anaerobe* 2002;8:301–305.
43. Snyderman R. D, Jacobus V. N, McDermott A. L, Ruthazer R, Golan Y, Goldstein J. C. E, Finegold M. S, Harrell J. L, Hecht W. D, Jenkins G. S, Pierson C, Venezia R, Yu V, Rihs J, Gorbach L. S. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997–2004. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1649–1655.
44. Turgeon P, Turgeon V, Gurdeau M, Dubois J, Lmothe F. Longitudinal study of susceptibility of species of the *Bacteroides fragilis* group to five antimicrobial agents in three medical centers. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2276–2279.
45. Philips I, King A, Nord CE, Hoffstedt B. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect* 1992;11:292–304.
46. Hedberg M, Nord CE. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:475–488.
47. Koeth M. L, Good E. C, Appelbaum C. P, Goldstein J. C. E, Rodloff C. A, Claros M, Dubreuil J. L. Surveillance of susceptibility patterns in 1297 European and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxiclav and five other antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:1039–1044.
48. Ueno, K, N. Kato, and H. Kato. The status of research on anaerobes in Japan. *Clin. Infect. Dis* 2002;35:54–57.
49. 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;52:3161–3168.
50. Şen A. Klinik örneklerden anaerobik bakteri izolasyonu ve antibiyotik duyarlılıkları. Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Askeri Tıp Fakültesi, Uzmanlık tezi, Ankara, 1995.
51. Zandi H, Gürler N. Muayene maddelerinden izole edilen anaerob gram negatif çomakların identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2002;32:58–68.
52. Mamal Torun M, Bahar H, Yüksel P. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Bacteroides fragilis* grubu bakterilerin antimikrobiklere direnç durumları ve betalaktamaz aktiviteleri. *ANKEM Derg* 2000;14(1):104–110.
53. Mutlu E, Yücesoy M. Anaerob bakterilerde  $\beta$ -laktamaz aktivitesinin ve antibiyotik duyarlılığının agar dilüsyon ve E-test yöntemleri ile belirlenmesi. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2003;17: 275–280.
54. Erciş S, Tunçkanat F, Haşçelik G. Klinik örneklerden izole edilen anaerob gram negatif basillerin çeşitli antibiyotiklere direnç durumları. XXXI Türk Mikrobiyoloji Kongresi, p:036, Kuşadası-Aydın, 19–23 Eylül, 2004.
55. Ülger (Toprak) N, Aral C, İlki A, Özer A, Söyletir G. Hastanemizde izole edilen ilk imipenem dirençli *Bacteroides fragilis*: Fenotipik ve genotipik irdeleme. 4. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, s.200, PBP-2, Ankara, 25–28 Nisan, 2006.
56. Stubbs L. J. S, Brazier S. J, Talbot R. P, Duerden I. B. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of *Bacteroides* spp. and characterization of nitroimidazole resistance genes. *J Clin Microbiol* 2000;38:3209–3213.