

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
ANKARA

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ANAEROP
BAKTERİLERİN LABORATUVAR TANISI VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

Sinem KAYA
Biyolog Sivil Memur

Yüksek Lisans Tezi

ANKARA
2012

**T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ANAEROP
BAKTERİLERİN LABORATUVAR TANISI VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

**Sinem KAYA
Biyolog Sivil Memur**

**Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinin
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dz. Tbp. Alb
Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU**

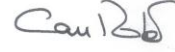
**ANKARA
2012**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

“Klinik Örneklerden İzole Edilen Anaerop Bakterilerin Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof. Dz. Tbp. Kd. Alb. Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU

Üye : Prof. Hv. Tbp. Tuğg. Can Polat EYİGÜN



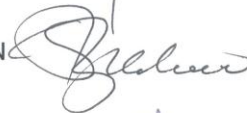
Üye : Prof. Dz. Tbp. Kd. Alb. Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU



Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Ali ALBAY



Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Şinasi YILDIRAN



Üye : Doç. Tbp. Kd. Alb. Mehmet Ali SARAÇLI



ONAY: Biyolog Svl. Me. Sinem KAYA'nın 18.06.2012 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Ufuk DEMİRKILIÇ

Prof. Tbp. Tuğg.

Sağ. Bil. Enst. Müdürü

TEŞEKKÜR

“Klinik Örneklerden İzole Edilen Anaerop Bakterilerin Laboratuvar Tanısı ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ” konulu yüksek lisans tezi GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu’nun 11 Ekim 2011 gün ve 207 sayılı oturumunda kabul edilmiş olup, GATA Etik Kurulu’nun 01.11.2011 tarih ve Y. ETİK. KRL. : 1491-393-11/1539-271 sayılı kararı ile çalışmaya başlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim süresince büyük katkı ve emeği olan tez danışmanım ve Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Başkanı Prof. Dz. Tbp. Alb. Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU ve Yrd. Doç. Tbp. Alb. Mustafa GÜNEY başta olmak üzere tüm değerli öğretim üyelerine ve ayrıca eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen Uz. Öğc. Dz. Tbp. Kd. Ütgm. Serhat DUYAN, Uz. Öğc. Dz. Tbp. Kd. Ütgm. Berksan ŞİMŞEK’e teşekkürlerimi borç bilir, saygılarımı sunarım. Yüksek lisans eğitimim süresince başta laboratuvarımız çalışanlarından Sağ. Kd. Bçvş. Deniz POLAT olmak üzere, Tıbbi Mikrobiyoloji AD.’nın tüm personeline yaptıkları katkılardan dolayı minnettarım.

Bu çalışma GATA Araştırma Bilimsel Kurul Başkanlığının AR-2011/70 numaralı projesi kapsamında desteklenmiştir.

Biyolog Sinem KAYA

Ankara

Haziran 2012

ÖZET

Klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin laboratuvar tanısı ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Bu çalışmada hastanemizde değişik kliniklerden anaerop enfeksiyon şüphesiyle gelen 345 çeşitli klinik örnek işleme alınarak, anaerop bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu 345 klinik örneğin 49'u laboratuvar reddetme kriterlerine göre işleme alınmamış, geri kalan 296 klinik örnekten 26 anaerop bakteri izole edilmiştir. Çalışmamızda 26 anaerop bakterinin 18'inin cins ve tür düzeyinde identifikasyonu yapılmıştır. Diğer 8 anaerop bakterinin tanımlanması ise Gram boyama düzeyinde yapılarak kliniklere bildirilmiştir. Bakterilerin identifikasyonunda klinik örneğin makroskopik ve mikroskopik incelemesinin yanı sıra, yarı otomatize sistem API 20A kullanılmıştır. İzole edilen bakterilerin 11'inin antimikrobiyal duyarlılığı belirlenebilmiştir. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi için CLSI'nın referans yöntem olarak belirlediği agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. İzolasyon oranı düşük olduğundan istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Anahtar kelimeler	:	Anaerop, Agar dilüsyon, E-test, Antimikrobiyal duyarlılık
Destekleyen Kurumlar	:	GATA Araştırma Bilimsel Kurul Başkanlığı
Yazar adı	:	Bio. Svl. Me. Sinem KAYA
Danışman	:	Prof. Dz. Tbp. Alb. Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU

SUMMARY

Laboratory identification of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens and determination of their antibiotic susceptibilities

In this study, it was aimed to isolate and identify the anaerobic bacteria from different clinical specimens (n: 345) submitted to our laboratory when an anaerobic infection was suspected in patients. In addition, the determination of antimicrobial susceptibilities of isolated organisms was also planned. Of 345 clinical samples, the 49 samples were rejected when rejection criteria were applied. A total of 26 anaerobic bacteria was isolated from the samples (n: 296) handled. Of these 26 isolates, 18 were identified to genus and species level. The identity of the remaining isolates (n: 8) was limited to their Gram stained characteristic and they were reported to the related clinics only with this information. In identification process, both macroscopic and microscopic examinations along with the use of a semi-automated identification system, API 20A, were performed. The antimicrobial susceptibility testing was performed only for 11 anaerobic bacteria isolated. For the susceptibility testing, the agar dilution technique recommended as the reference method by CLSI was used. Statistical analysis could not be performed due to low rate of isolation.

Key Words : Anaerobe, Agar dilution, E-test, Antimicrobial susceptibility
Supported by : Department of Scientific Research Committee, GATA.
Author : Bio. Civil Servant Sinem KAYA
Counsellor : Professor Ahmet Celal BASUSTAOGU, M.D.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
İNGİLİZCE ÖZET.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLOLAR DİZİNİ.....	xiii
I. GİRİŞ.....	1
II.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Giriş.....	3
2.2. Anaerop bakteri nedir?.....	4
2.3. Anaerop bakterilerin sınıflandırılması ve sınıflamada yenilikler.....	4
2.4. Anaerop bakterilerin insan florasındaki dağılımı.....	6
2.5. Anaerop bakterilerde virülans faktörleri.....	6
2.6. Anaerop enfeksiyonları hazırlayan faktörler.....	7
2.7. Anaerop bakteri enfeksiyonlarını düşündüren faktörler.....	7
2.8. Anaerop bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar.....	8
2.9. Örneklerin alınması ve taşınması.....	10
2.9.1. Tüp veya şişeler.....	15
2.9.2. Eküvyon/plastik kap sistemi.....	15
2.9.3. Plastik torba sistemi.....	15
2.10. Örneklerin işleme alınması.....	15
2.10.1. Makroskopik inceleme.....	15
2.10.2. Mikroskopik inceleme.....	16
2.10.3. Ekim ve izolasyon için algoritma.....	17
2.11. Anaerop bakteri izolasyonunda kullanılan besiyerleri.....	19
2.11.1. Selektif olmayan genel üretim agar besiyerleri.....	20
2.11.1.1. Anaerop kanlı agar (CDC).....	20

2.11.1.2. Brucella kanlı agar (BA).....	21
2.11.1.3. Schadler agar.....	22
2.11.2. Selektif agar besiyerleri.....	22
2.11.2.1. Kanamisin-vankomisin (KV) hemolize kanlı agar.....	22
2.11.2.2. Bacteroides safra eskülin (BBE) agar	23
2.11.2.3. Fenil-etil alkollü (PEA) agar.....	25
2.11.2.4. Yumurta sarılı agar (Egg yolk agar- EYA).....	25
2.11.2.5. Sikloserin-sefoksitin-fruktoz agar (CCFA).....	27
2.11.3. Geri-dönüş sıvısı.....	27
2.11.3.1. Zenginleştirilmiş thioglycolate broth.....	27
2.11.3.2. Etli-glukozlu besiyeri.....	28
2.12. Anaerop kültür için kullanılan inkübasyon sistemleri.....	29
2.12.1. Anaerop jar tekniği.....	29
2.12.2. Anaerop plastik poşet sistemi.....	30
2.12.3. Anaerobik kabin sistemi.....	30
2.13. Kültürlerin inkübasyonu.....	30
2.14. Kültürlerin değerlendirilmesi.....	31
2.15. Anaerop bakterilerin tanımlanması.....	33
2.15.1. Seviye 1 tanımlama.....	33
2.15.2. Seviye 2 tanımlama.....	33
2.15.3. Seviye 3 tanımlama.....	34
2.16. Anaerop bakterilerde duyarlılık test yöntemleri.....	35
2.16.1. Agar dilüsyon.....	36
2.16.2. Broth mikrodilüsyon.....	36
2.16.3. Broth disk elüsyon ve disk diffüzyon testi.....	36
2.16.4. E-test.....	36
2.17. Anaerop bakterilerde β -laktamaz aktivitesinin saptanması.....	38
2.18. Anaerop bakterilerde antimikrobiyal direnç.....	39
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
3.1. Kullanılan besiyerleri, cihazlar, kitler.....	42
3.1.1. Brucella kanlı agar (BA).....	42
3.1.2. Zenginleştirilmiş tioglikolat besiyeri.....	42

3.1.3. Skim milk.....	43
3.1.4. Anaerop kabin.....	43
3.1.5. API 20A.....	44
3.1.5.1. Gerekli malzemeler.....	44
3.1.5.2. Ayıraçlar.....	44
3.1.6. β -laktamaz varlığının tespiti.....	44
3.1.7. Katalaz testi.....	44
3.2. Yöntem.....	45
3.2.1. Örneklerin toplanması.....	45
3.2.2. Örneklerin işleme alınması.....	45
3.2.3. Kültür.....	46
3.2.4. İzole edilen mikroorganizmaların tanımlanması.....	48
3.2.5. İzole edilen anaerop bakterilerde antimikrobiyal direncin belirlenmesi.....	49
3.2.6. Agar dilüsyon için kullanılan besiyerinin hazırlanması.....	49
3.2.7. Antimikrobik ilaçların stok çözeltilerinin hazırlanması.....	49
3.2.8. Bakteri inokulumunun hazırlanması.....	51
3.2.9. Ekim ve değerlendirme.....	52
3.2.10. Sonuçların yorumlanması.....	53
IV. BULGULAR.....	54
V. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
VI. KAYNAKLAR.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	: Adenozin trifosfat
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
CO ₂	: Karbondioksit
UV	: Ultraviole
BA	: Brucella Agar
KV	: Kanamisin-vankomisin hemolize kanlı agar
µg/ml	: Mikrogram/mililitre
BBE	: Bacteroides safra eskülin (bile esculin) agar
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
PEA	: Fenil-etil alkollü agar
EYA	: Yumurta sarılı agar (Egg yolk agar)
CCFA	: Sikloserin-sefoksitin-fruktoz agar
nm	: Nanometre
THIO	: Tiyoglikolat
N ₂	: Azot
H ₂	: Hidrojen
PRAS	: Pre-Reduced Anaerobically Sterilized (Anaerobik koşullarda sterilize edilen önceden indirgenmiş besiyeri)
°C	: Santigrat derece
CDC	: Centers for Disease Control
µg	: Mikrogram
SPS	: Sodyumpolianetolesülfonat
mm	: Milimetre
AMD	: Proline arylamidase
rDNA	: Ribozomal DNA (Deoksinükleit asit)
MALDI-TOF MS	: Matrix-aracılı lazer desorpsiyon-kütle spektrofotometrisi
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
ATCC	: American Type of Culture Collection
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi

EMB	: Eosin Methylene Blue Agar
USA	: United States of America
API	: Anaerobe Phenotypic Identification
UK	: United Kingdom
ml	: Mililitre
NaOH	: Sodyum hidroksit
CFU/ml	: colony-forming units per milliliter
TTA	: Transtrakeal aspirat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Anaerop bakteriler için başlangıç identifikasyonu	18
2.2. Kanlı-çikolatalı genel üretim besiyerinde pigment yapmış Gram-negatif anaerop basilin saf kültürü	19
3.1. Anaerobik kabin	43
3.2. API 20A ile yapılan anaerop bakteri identifikasyonu	49
3.3. Agar dilüsyon yapılmış antibiyogram plağı	53

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Vücutun çeşitli bölgelerinin floralarında bulunan anaerop-aerop bakteri oranları.....	6
2.2. Anaerop bakterilerle oluşan hastalıklar.....	9
2.3. Anaerop enfeksiyonların vücuttaki dağılımı ve anaerobik etkenlerin oranları.....	11
2.4. Anaerop kültür için enfeksiyon bölgesine göre uygun örnek ve örnek alma yöntemi.....	14
2.5. Anaerop bakterilerin koloni morfolojileri ve renkleri, pigment oluşturmaları UV ışığında floresan verme özellikleri, agarda çukurlaşma yapmaları, hemoliz oluşturmaları ve kokularına göre muhtemel tanıları.....	32
2.6. Özel potense sahip antibiyotik diskleri ile duyarlılıklara bakılarak yapılan tanımlama.....	34
2.7. Anaerop bakterilerle yapılan çalışmalarda duyarlılık test yöntemlerine ait karşılaştırmalar.....	37
2.8. Anaerop bakterilerle yapılan çalışmalarda duyarlılık test yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.....	38
3.1. Anaerop kültür için değerlendirmeye alınan örnekler ve anaerop bakteri izolasyon oranları.....	47
3.2. Antimikrobik ilaçların stok çözeltilerinin hazırlanması için gerekli çözücüler, sulandırıcılar ve bu antimikrobiklerin potens değerleri	50
3.3. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Referans Aralıkları.....	52
4.1. Klinik örnek tiplerine göre izole edilen bakteriler.....	55
4.2. Agar dilüsyon yapılarak MİK değerleri belirlenen anaerop bakteriler ve β -laktamaz sonuçları.....	56

I – GİRİŞ

Anaerop bakteri enfeksiyonlarının klinik olarak tanımlanması çok eskilere dayanmaktadır. İlk olarak Hipokrat M.Ö. 4'üncü yüzyılda tetanozu tanımlamış, Antonie Van Leeuwenhoek 17. yüzyılın sonlarında kendi geliştirdiği mikroskopta gördüğü canlıların havasız ortamda hareket ettiğini bildirmiştir. Pasteur ise 1861'de havasız ortamda bazı mikroorganizmaları üretmiş ve daha sonra 1863 yılında oksijensiz ortamda üreme özelliklerine göre mikroorganizmaları aerop ve anaeroplara olmak üzere ikiye ayırmıştır. İlerleyen yıllarda, çeşitli *Clostridium* türleri izole edilmeye başlanmıştır. Anaerop bakteriyolojiye büyük katkıları olan Veillon ve Zuber 1800'lü yılların sonunda, Meleney ve Altemeier isimli iki cerrah ise 1930'lu yıllarda anaeroplara ilgili önemli çalışmalarda bulunmuşlar, kötü kokulu cerrahatli yaralarda, anaerop bakterilerin rolü olduğunu belirtmişlerdir. Yine 20. yüzyılın başlarında fusiform bakteriler ve anaerop spiroketlerin neden olduğu çeşitli enfeksiyonlar araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Bu dönemde Schottmueller lohusalık hummasının endojen kaynaklı olduğunu ve etkenin anaerop koklar olabileceğini ileri sürmüştür (1, 2).

Anaerop bakterilerin izolasyonu için gerekli olan anaerop koşulların sağlanmasında kullanılan anaerop kavanozlar, 20'nci yüzyılın ilk çeyreğinde geliştirilmiştir. *Clostridium* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar 1960'lı yıllara kadar anaerop bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar içinde en çok incelenen grubu oluşturmuştur. Bunun nedeni olarak da sporsuz anaerop bakterilerin izolasyonunda yaşanan güçlükler gösterilmiştir (1).

Anaerop bakteriler vücutta gastrointestinal sistem, deri ve mukozal membranlar başta olmak üzere vücudun birçok bölgesinde normal bakteri florası olarak yer almaktadır (1, 2, 3). Anaerop bakteriler vücutta pek çok madde sentezleyerek, enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların kolonizasyonunu önlemekte, hatta bağışıklık sistemini dolaylı olarak etkileyerek vücuda yararlı olmaktadır (1). Yağ absorpsiyonu ve kolesterol regülasyonunda da rolleri vardır (4). Ancak malignite, diyabet gibi özel durumlarda, cerrahi müdahale ve travma sonrası gibi doku bütünlüğünün

bozulduğu durumlarda, anaerop bakteriler baskın olarak bulundukları doku ve organlarda submukozal yüzey ve damarlardan geçiş yaparak ciddi seyirli hastalıklara neden olabilmektedirler. Bazı anaerop bakteriler ise enzim ve toksin yönünden zengindir. Dolayısıyla bu mikroorganizmalar anatomik bariyerleri aşarak toksijenik ve septik sendromlara neden olurlar (2, 3). Buna ilave olarak, artan antimikrobiyal direnç ile birlikte, anaerop bakteriler morbidite ve mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (5, 6).

Bu çalışmada, GATF (Gülhane Askeri Tıp Fakóltesi) Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD. bakteriyoloji laboratuvarına gelen klinik örneklerden, enfeksiyon etkeni olabilecek anaerop bakterilerin izolasyon oranlarının belirlenmesi, izole edilen anaerop mikroorganizmaların tanımlanması ve bu mikroorganizmaların antimikrobiyal direnç profillerinin belirlenerek bundan sonraki çalışmalara yol gösterecek sürveyans verilerinin elde edilmesi ve etkin tedavilere yol gösterilmesi amaçlanmıştır.

II - GENEL BİLGİLER

2.1.Giriş

Bazı bakteriler nonfermantatif olarak enerji temin etmek suretiyle 1 mol glukoz molekülünden 38 mol ATP veya Kreb's döngüsü ile 15 mol ATP sentezleyerek enerji elde etmektedir. Bunun için hücrede flavinler, sitokromlar ve demirli bileşikler kullanılmaktadır. NAD ve NAD⁺, NADH₂'ye yükseltgenir. Bu bakterilerin sitoplazmik membranlarındaki son elektron alıcısı oksijendir. Bu nedenle bu bakterilere aerob bakteriler denir.

Bazı bakteriler ise fermentatif metabolizmaya sahiptirler ve 1 mol glikoz molekülünden 2 mol ATP elde eder. Hücre membranlarında son elektron alıcısı ise nitrat, sülfat gibi inorganik azotlu bileşikler olabileceği gibi, fumarat, siyanür, karbonmonoksit, karbondioksit, polihidrik alkol gibi organik bileşikler de olabilmektedir. Bu bakteriler oksijene gereksinim duymamaktadır. Hatta ortamdaki oksijen varlığı bu bakteriler için zarar vericidir. Bu grup bakterilere ise anaerobik bakteriler denmektedir (5). Hayati fonksiyonlarının devamı için gerekli olan oksijene duyarlılıklarına göre bakteriler şu şekilde sınıflandırılır (7):

1. Zorunlu aerob bakteriler: Bazı bakteriler oksijensiz ortamda hiç üreyemezler ya da çok silik koloniler yaparlar. Bunlara zorunlu aerob adı verilir. *Bacillus*, *Legionella*, *Pseudomonas* cinslerinin üyeleri ve *Mycobacterium tuberculosis* bu gruba örnektir.

2. Fakültatif anaerob veya fakültatif aerob bakteriler: Hem oksijenli, hem de oksijensiz ortamda üreyebilen bakterilerdir. Oksijen varlığında enerji elde etmek için aerobik solunum, yokluğunda ise fermentasyon veya anaerobik solunumu kullanırlar. Daha fazla enerji sağlayan oksijenli ortamda daha iyi ürerler. Katalaz ve süperoksit dismutaz enzimleri vardır. Bu grubun en iyi örnekleri *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Shigella* spp. ve *Salmonella* spp.'dir.

3. Mikroaerofil bakteriler: Bu grup bakteriler ise normal havadaki oksijen (Havadaki ortalama oksijen oranı %21'dir.) konsantrasyonunda canlılığını devam ettirememektedirler. Üremeleri ve canlılıklarının devamı için %4-6 oranında oksijene ihtiyaç duymaktadırlar. *Lactobacillus* ve *Camylobacter*

türleri bu gruba iyi birer örnektir. Mikroaerofil bakteriler en iyi %5 O₂, %10 CO₂, %85 N₂ bulunan ortamda üremektedir.

4. Aerotoleran anaeroplara: Normal atmosferde veya %5-10 CO₂'li ortamda ince bir üreme gösteren, anaerop ortamda daha iyi üreyen bakterilerdir. *Clostridium histolyticum*, *C. tertium* aerotoleran bakterilerdendir. Aerotoleran ve mikroaerofil bakteriler arasındaki sınır keskin değildir.

5. Zorunlu anaerop bakteriler: Tamamen oksijensiz ortamda üreyen veya %0,5'den daha fazla oksijen varlığında üreyemeyen bakterilerdir. *Clostridium haemolyticum*, *C. novyi* tip B, *Selenomonas ruminatum*, *Treponema denticola*, *Bacteroides gracilis* bu gruba örnektir (7, 8).

2.2. Anaerop bakteri nedir?

Anaerop bakteriler, ortamda oksijen bulunmadığında üreyebilen mikroorganizmalar olarak kabaca tanımlanmalarına rağmen, çeşitli anaerop bakterilerin oksijene olan ilgileri farklı olmaktadır. Buna göre anaerop bakteriler, oksijene olan duyarlılıkları değişkenlik gösteren, üreyebilmeleri için ortamdaki serbest oksijenin uzaklaştırılmasına ihtiyaç duyan, normal atmosferik koşullarda ve %5-10 karbondioksitli ortamda katı besiyerinde üreyemeyen bakterilerdir. Anaerop bakterilerin üremeleri, ortamdaki oksijen konsantrasyonu, superoksit radikal konsantrasyonu, peroksitler ve oksidasyon-redüksiyon potansiyeline bağlıdır (7).

2.3. Anaerop bakterilerin sınıflandırması ve sınıflamada yenilikler

Anaerop bakteriler morfolojik özelliklerine göre şu şekilde sınıflandırılırlar:

1. Gram pozitif koklar

- *Peptostreptococcus*
- *Peptococcus*

2. Gram negatif koklar

- *Veillonella*

3. Gram pozitif basiller

- *Clostridium* sp.^a
- *C. perfringens* ile benzer türler
- *Propionibacterium*
- *Eubacterium*
- *Actinomyces*
- *Bifidobacterium dentium*

4. Gram negatif basiller

- *Bacteroides fragilis* grubu^b
- Diğer *Bacteroides* türleri
- *Fusobacterium*
- *Prevotella*
- *Porphyromonas*
- *Bilophila wadsworthia*

^a *C. histolyticum*, *C. novyi*, *C. septicum* ve *C. sordellii*.

^b *Bacteroides fragilis* grubu; *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron* ve diğer alt türleri içerir.

Kabaca yapılan bu taksonomide moleküler tekniklerin kullanıma girmesi, bakterilerin sınıflandırmasında değişikliklere yol açmış ve belli taksonlar arası ilişkiler artarken bazıları ise grubundan ayrılarak farklı bir taksona dahil edilmiştir. Bunlara ek olarak antimikrobiyal duyarlılık paternleri ile fenotipik tanı yöntemlerinin sınırlılıklarına rağmen önemlerini koruması sınıflandırmada büyük değişikliklere neden olmuştur. Örneğin Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroides, Fusobacterium ve Proteobacteria şubesi içine pek çok yeni tür ve cinsler tanımlanmış yeni taksonlara dahil edilmiştir (9).

2.4. Anaerop bakterilerin insan florasındaki dağılımı

Anaerop bakteriler, vücudun normal florasında baskın olarak hatta birçok organda aerop bakterilerden sayıca daha fazla olarak bulunmaktadır (10). Tablo 2.1’de çeşitli vücut bölgelerinde anaerop-aerop bakteri oranları verilmiştir.

Tablo 2.1: Vücudun çeşitli bölgelerinin florasında bulunan anaerop-aerop bakteri oranları (4, 11).

Anatomik bölge	Anaerop/aerop oranı
Üst solunum yolları	1/1
Burun yıkantı suyu	1/1
Tükürük	1/1
Diş plakları, diş yüzeyi cepleri	1000/1
Gastrointestinal sistem, mide	1/1
İnce bağırsak	1/1
İleum	1/1
Kolon	1000/1
Kadın genital sistemi	
Endoserviks	1-5/1
Vajina	1-5/1

2.5. Anaerop bakterilerde virülans faktörleri

Anaerop bakteri enfeksiyonlarının patogeneğinde bakteriye ait virülans faktörleri önemli role sahiptir. Bunlar arasında adezyon faktörleri (kapsül, fimbria, hemagglütinin, lektin, koagregasyon), invazyon faktörleri (fosfolipaz C), ekzoenzimler (hemolizin, proteaz, kollajenaz, fibrinolizin, nöraminidaz, heparinaz, kondroitin sülfataz, glukronidaz ve N-asetil glukozaminidaz), antifagositik ve antilitik faktörler (kapsül, lipopolisakkarit, IgA, proteaz) ve metabolik ürünler (uçucu yağ asitleri, sülfür bileşikleri, aminler) sayılabilir (12).

2.6. Anaerop enfeksiyonları hazırlayan faktörler

Vücutta flora bakterisi olarak çok fazla sayıda bulunan anaerop bakteriler, normal koşullarda hastalık oluşturmamakta, ancak belli koşullarda enfeksiyona neden olmaktadır. Anaerop enfeksiyonu hazırlayıcı faktörler aşağıda sıralanmıştır (4, 11):

1. Diyabet,
2. Kortikosteroid kullanımı
3. Nötropeni,
4. Hipogamaglobulinemi,
5. Malignite,
6. İmmünsüpresyon,
7. Sitotoksik ilaç kullanımı,
8. Splenektomi,
9. Kollajen doku hastalıkları,
10. HIV enfeksiyonu,
11. Konjenital ve sonradan oluşan humoral bağışıklık eksiklikleri,
12. Kompleman sistemi bozuklukları.

Yukarıda sayılan hastalıklar ve burada sayılamayan pek çok hastalıkta, vücudun anatomik bütünlüğünün bozulması sonucunda anaerop bakterilerin flora bakterisi olarak bulundukları bölgelerden özellikle steril başka bölgelere geçmesi sonucunda anaerop enfeksiyonların gelişmesi ortak özellik olarak ortaya çıkmaktadır. Bir başka ifade ile anaerop enfeksiyonların çoğunluğu floradan köken aldığından anaerop enfeksiyonlar endojen kaynaklı enfeksiyonlardır. Bu yüzden konağın sağlık durumu ile birebir ilişkilidir.

2.7. Anaerop bakteri enfeksiyonlarını düşündüren faktörler

Anaerop bakterilerin izole edilmesi ve tanımlanmasının zahmetli,

zaman alıcı, maliyetli olması ve öneminin yeterince anlaşılamaması nedeniyle bu tür enfeksiyonlar sıklıkla göz ardı edilmektedir. Ancak bazı belirti ve bulgular anaerop enfeksiyonu düşündürmektedir. Bunlardan en önemlisi bir organ veya dokuda, lezyon bölgesinden gelen kötü kokudur. Bunun dışında bazı özellikler klinisyenlere enfeksiyon bölgesinde anaerop bakteri varlığını düşündürmelidir (1):

1. Lezyon ve lezyon bölgesinden gelen akıntıda kötü koku,
2. Enfeksiyon bölgesinin mukoza yüzeyine uzaklığı,
3. Dokuda veya akıntıda gaz gözlenmesi,
4. Doku nekrozu, gangren ve apse oluşumu (krepitasyon),
5. Septik tromboflebitler,
6. Malignitesi olan hastalarda gelişen enfeksiyonlar (Kolon, uterus, akciğer kanserleri gibi)
7. Kanlı eksudaların siyah renk alması, ultraviyole ışık altında floresans vermesi,
8. İnsan ve hayvan ısırıklarından sonra gelişen enfeksiyonlar,
9. Aminoglikozidler, trimetoprim-sulfametoksazol, birinci jenerasyon kinolonlar, monobaktam ve anaeroplara etkisi yetersiz olarak bilinen seftazidim gibi antibiyotiklerle cevap alınamayan tedavi,
10. Rutin kültürde üreme olmamasına rağmen gram boyamada mikroorganizma görülmesi.

2.8. Anaerop bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar

Anaerop bakterilerden kaynaklanan hastalıklar Tablo 2.2'de belirtilmiş olup, iki bölümde incelenebilir:

1. Endojen kaynaklı anaerop enfeksiyonlar,
2. Ekzojen kaynaklı anaerop enfeksiyonlar.

Tablo 2.2: Anaerop bakterilerle oluşan hastalıklar (11).

1. Endojen kaynaklı anaerop enfeksiyonlar	
a. <i>Clostridium</i> türlerinin neden olduğu hastalıklar	Tetanoz, Gazlı gangren, <i>C. difficile</i> kaynaklı psödomembranöz kolit
b. Cerahatli ve septik anaerop enfeksiyonlar	Diş, kulak-burun-boğaz, merkezi sinir sistemi, abdominal ve perineal, kadın genital organ, idrar yolu, kemik-elem, deri ve deri altı, kas enfeksiyonları, sepsis, endokardit
2. Ekzojen kaynaklı anaerop enfeksiyonlar	
a. Besin zehirlenmeleri	Botulizm <i>C. perfringens</i> besin zehirlenmesi, <i>C. perfringens</i> ile oluşan nekrotik enterokolit
b. Yara enfeksiyonları	Tetanoz, gazlı gangren, krepitan selülit, benign yüzeyel enfeksiyonlar, insan ve hayvan ısırıkları sonrası gelişen enfeksiyonlar, yara botulizmi
c. Kontamine aletler	Septik düşükler
d. Hastane kökenli	<i>C. difficile</i> diyareleri

Aneorop bakterilerin neden olduğu bu enfeksiyonlar vücudun pek çok bölgesinde gelişmektedir. Hem klinisyenler hem de mikrobiyoloji uzmanları son yıllarda anaerop bakteri enfeksiyonları hakkında çok şey bilmelerine rağmen hala en sık gözden kaçan mikroorganizma grubudur. Ayrıca izolasyonlarının hem zahmetli, zaman alıcı hem de pahalı olması bir başka dezavantajdır. Buna rağmen anaerop enfeksiyon oranları bazı vücut

bölgelerinde %100 civarındadır. Anaerop bakterilerin neden olduğu enfeksiyon oranları ise Tablo 2.3'te sunulmuştur.

2.9. Örneklerin alınması ve taşınması

İyi bir anaerop bakteri kültürü, uygun yerlerden seçilmiş, uygun olarak alınmış ve laboratuvara uygun transportla ulaştırılmış örneklerle yapılabilir. Anaerop kültürlerin başarılı olmasında klinikler ve laboratuvarlar arasındaki haber verme/reddetme sisteminin önemi büyüktür(6). Anaerop bakteri enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı klinik örneğin uygun bir şekilde alınması ile başlar (1, 3, 7, 13, 14). Anaerop ekime uygun örnekler daha çok, etken kaynağı olması en muhtemel olan steril vücut sıvıları, doku örnekleri, biyopsi örnekleri, aspirat örnekleri veya cerrahi aspirasyon sıvılarıdır (3, 5, 7, 13, 16). Çevre dokular ve cilt komşuluğu nedeniyle flora bakterileri ile kontamine olan örneklerin tanısız değeri yoktur. Derin cilt dokuları ve mukoz membranlardan örnek alınırken yüzey kontaminasyonundan mutlaka kaçınılmalıdır. Yüzey kontaminasyonundan kaçınmak için cilt yüzeyi %10'luk povidon iyot ile temizlenir. Daha sonra 1 dakika %70'lik etil alkol veya izopropil alkol ile povidon iyot uzaklaştırılarak alkolün kuruması beklenir (15).

Örnekler kültüre alınmadan önce, oksijenin zarar verici etkisinden korunmalıdır. Anaerop inceleme için alınan örneklerin, uygun transport besiyerleri içinde laboratuvara gönderilmesi, transport besiyeri yoksa hasta başında zenginleştirilmiş tioglikolat broth gibi sıvı anaerop besiyerlerine inokulasyonları önerilir (16). Oda ısısı, örneklerin transportu için en uygun ısıdır. Çünkü oksijen düşük ısılarda örneğe daha iyi diffüze olur.

Tablo 2.3: Anaerop enfeksiyonların vücuttaki dağılımı ve anaerobik etkenlerin oranları (1).

Enfeksiyon Türü ve Bölgesi	Anaeroplara Oranı
Kronik sinüzit	%52
Kronik otitis media	%59
Boyun bölgesi enfeksiyonları	%100
Boğaz, boyun bölgesinin operasyonu sonrası gelişen yara enfeksiyonları	%95
Peritonsiller apse	%94
Diş apseleri	%94-100
Diş kanalı enfeksiyonları	%100
Aspirasyon pnömonisi	%93
Bronşektazi	%56
İntraabdominal enfeksiyonlar	%86-94
Apendisit (peritonitli)	%92
Karaciğer apsesi	%52
Cerrahi sonrası intraabdominal enfeksiyonlar	%93
Safra yolları	%45
Obstetrik ve jinekolojik enfeksiyonlar	%72-100
Pelvik apseler	%88
Vulva-vajinal apse	%75
Septik abortus	%69
Pelvik inflamatuvar hastalık	%2-5
Clostridium dışındaki anaeroplara etken olduğu selülitler	%75
İnsan ısırık yaraları	%50-56
Diyabetik ayak yaraları	%95
Yumuşak doku apseleri	%60
Bakteriyemili dekübitis ülserleri	%63

Anaerop bakteriler uygun bir anaerop transport ortamında, klinik örneğin niteliğine bağlı olarak günlerce canlı kalabilir. Bir örnekle açıklayacak olursak; pürülan örnekler birçok indirgen bileşikler içerirler, dolayısıyla bu örneklerin pürülan olmayan sıvı örneklerine göre, anaerop bakterilerin lehine daha koruyucu bir etkisi vardır. Anaerop bakteriler özellikle belirli bir büyüklükteki doku örneklerinde daha iyi yaşamaktadır. Büyük hacimli sıvılar (periton sıvısı gibi) ya da büyük doku parçaları (steril tuzlu su ilave edilerek) steril bir kapta, taşıma besiyerine gereksinim olmaksızın taşınabilir. Dışkı ve idrar örnekleri gibi bazı örnekler, bakteri içeriğini azaltan enzimlere sahip olduklarından, olabildiğince kısa zamanda ekilmelidirler. Anaerop kültür için pürülan sıvılar en iyi iğne ve enjektör ile alınır (7, 16). Aspire edilmiş materyaller şırınga ile transport edilmemelidir. Şırınga ile yapılan transport, batma gibi yaralanmaların yanı sıra, kolayca hareket edebileceğinden örneğin sızıntısına, zedelenmesine ve enjektörde oksijen sızıntısına neden olabilmektedir. Ancak, taşıma ortamı sağlanamayan ve örneğin hemen gönderilmesi gerektiği durumlarda taze eksüda ve sıvı örnekler içindeki hava kabarcığı dikkatli bir şekilde çıkarıldıktan sonra, iğnenin ucuna steril bir koruyucu konularak laboratuvara ulaştırılmalıdır. Çeşitli ticari firmalar, anaerobik ortam için indirgen madde içeren şişeler üretmektedir. Bu şişeler şırınganın kolayca enjekte edilebileceği plastik kapağa sahip olduğundan, anaerop bakterilerin canlı kalmasını sağlamaktadır. Eğer anaerobik transport şişeleri yoksa vücut sıvıları steril tüplerle transport edilebilir. Bu örnekler pürülan ve miktarı 1.0 ml'den fazla ise, içerdikleri anaerop bakteriler saatlerce canlı kalabilir. Pürülan olmayan sıvılar olabildiğince hava boşluğu kalmayacak şekilde doldurulan küçük kaplarla (tüp, şişe gibi) taşınabilir. Örnekler çalkalanmayacak şekilde, oda ısısında taşınmalıdır (7).

Svablar ile alınan sürüntü örnekleri anaerop bakteri izolasyonu için uygun olmayan ve en az kabul gören örneklerdir. Çünkü svablar bunlar ile alınan örneklerin gerçek anlamda anaerop enfeksiyon kaynağı mikroorganizmalardan çok, yüzeyde kolonize olmuş mikroorganizmaları içerdiği tespit edilmiştir (13). Aynı zamanda pamuklu svablarla yeterince örnek alınamaması, svab pamuğuna yapışan yağ asitleri ve pamuğun tuttuğu

oksijenin anaeroplara toksik etki yapması gibi nedenlerle, sürüntü örnekleri anaerop kültür için kabul edilmemelidir. Ancak operasyon sırasında anaerop kültür için kullanılabilirler (7). Svablar çeşitli ticari firmalardan elde edilebilen, yumuşak agar içeren anaerop transport ortamında taşınabilir. Bu svablar transport tüpünün dibindeki agarın içine yerleştirilir, çubuğu kırılır ve ağzı hemen kapatılır. Eğer transport besiyeri yoksa laboratuvara kabul edildikten sonra, svab ile alınan materyal, bir miktar sıvı besiyerinin içinde süspanse edilmelidir. Transportta kalan örnek olursa, bir pipet yardımıyla alınmalı ve süspanse edilmiş sıvı besiyerine eklenmelidir. Eğer transport işlemi saatlerce süren bir zaman aralığı gerektiriyorsa mutlaka anaerobik transport besiyeri kullanılmalıdır (5, 13).

Doku örnekleri ise ağzı gevşek olarak kapatılmış tüplerin içinde, anaerobik torbalarda transport edilmelidir (13).

Kan kültürleri ticari olarak üretilen anaerop şişeler ile taşınabilir. Esasında SPS (sodyumpolianetolesülfonat) patojenik *Neisseria* türlerinin ve *Peptostreptococcus anaerobius*'ün üremesini inhibe eder. Ancak kan, SPS'ye duyarlı mikroorganizmalara karşı SPS toksisitesini nötralize edebildiğinden, maksimum kan hacmi (8–10 ml.) varlığı bu organizmaların geri kazanımını optimize etmeye yardımcı olabilir. Şişelere 8 ml.'den az kan hacimleri inoküle edilmemelidir (7, 15).

Burundan alınan nazofaringeal sürüntü solunum sistemi örnekleri, ağızdan alınan solunum yolu örnekleri (korunmuş fırça tekniği hariç tüm örnekler), mide yıkantı suyu, dışkı örnekleri (*C. botulinum* ve fazla miktarda şüpheli bakteri üremesi hariç), idrar örnekleri, deri ve mukozalardan sürüntü ile alınmış tüm örnekler, otopsi örnekleri anaerop kültür açısından uygun olmadıklarından değerlendirmeye alınmamalıdır. Anaerop kültür için enfeksiyon bölgesine göre alınması gereken uygun örnek ve örnek alınma yöntemi Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4: Anaerop kültür için enfeksiyon bölgesine göre uygun örnek ve örnek alma yöntemi (7).

Anaerop Kültür için Kabul Edilebilir Örnekler		
Enfeksiyon Bölgesi	Uygun Örnek Tipi	Örnek Alma Yöntemi
Baş-boyun Bölgesi	Aspirat Doku biyopsisi	Perkütanöz iğne biyopsisi Cerrahi girişim ile
Periodontal Bölge	Gingiva bölgesi debris Aspirat	Steril 'paper point' İğne aspirasyonu
Akciğer	Akciğer aspiratı Doku biyopsisi Derin bronş sekresyonu Plevra sıvısı	Perkütanöz iğne aspirasyonu Cerrahi girişim ile Transtrokeal aspirasyon Korunmuş bronşiyal brush Bronkoalveolar lavaj Torasentez
Eklem	Eklem sıvısı	Perkütanöz iğne aspirasyonu
Abdomen	Periton sıvısı Apse muhtevası Safra Doku biyopsisi	Perkütanöz iğne aspirasyonu Cerrahi girişim ile aspirat Cerrahi girişim ile Cerrahi girişim ile
Kadın Genital Sistemi	Periton sıvısı Endometriyum materyali Doku biyopsisi	Kuldosentez Endometriyumdan emilim ile alınan materyal Cerrahi girişim ile
Kemik	Biyopsi	Cerrahi girişim ile
Diğer Yumuşak Dokular	Doku biyopsisi Aspirat Doku	Cerrahi girişim ile Perkütanöz iğne aspirasyonu Küretaj ile
Üriner Sistem	Mesane idrarı	Suprapubik aspirasyon

Anaerop kültür için alınan örneklerin taşınması amacıyla kullanılan çeşitli ticari sistemler vardır (7).

2.9.1. Tp veya şişeler

Anaerop mikroorganizmaların seyrelmesine neden olabilen sıvı transport besiyeri veya anaerop bakterilerin kuruyacakları boş, steril tüplere yerleştirilerek transport edildikleri diğerk yöntemlerden farklı olarak, %5 CO₂'li ortam, yarı katı besiyeri, indirgen madde (%1-5 glikoz, %0.1 sodyum tiyoglikolat, %0.1 askorbik asit gibi) ve resazurin indikatörü içermektedir. Tp şekli genelde pamuklu svab ile alınan örneklerin, şişe ise daha çok sıvı örneklerin taşınması için uygundur.

2.9.2. Eküvyon/plastik kap sistemi

İçinde Cary-Blair, Amies transport medium veya PRAS (Anaerobik Koşullarda Sterilize Edilen nceden İndirgenmiş Besiyeri) bulunan plastik tüp veya plastik kap içine svab yerleştirilmiştir.

2.9.3. Plastik torba sistemleri

CO₂ retici sistem, paladyum katalizör ve anaerop indikatör içeren şeffaf plastik torbalardır. Bu torbalar kullanılarak, torbadan çıkarılmaksızın ekim plaklarında üremenin olup olmadığı gözlemlenebilir. Ayrıca transport amaçlı kullanılabilirler. İçerdiği CO₂ miktarı %10'dan daha fazla olup, resazurin veya metilen mavisi indikatör ile ortamın anaerobik atmosfer kontrolü yapılır.

2.10. Örneklerin işleme alınması

2.10.1. Makroskopik inceleme

Laboratuvara gelen örneklerin makroskopik ve Gram yaymalarının incelenmesi anaerop kültür için büyük önem taşır. Örneklerin makroskopik ve Gram yaymalarının incelenerek bir ön rapor verilmesi, sonucu günler sonra alınabilecek anaerop kültür raporu beklenmeden tedavinin bir an önce başlayabilmesi açısından çok önemli olabilmektedir (7, 13, 14).

Klinik örnekteki kötü koku, sıvı örneklerdeki pürülan görünüm, nekrotik

doku varlığı, gaz ve sülfür taneciklerinin varlığı anaerop bakteriler hakkında değerli ipuçları verir. Bakteri metabolizmasından kaynaklanan uçucu yağ asitleri ve aminlere bağlı kötü koku hemen her zaman mevcuttur. Anaerop bakteriyolojide zaman çok önemli olduğundan bazı durumlarda geçici ön raporlar verilebilir. Bu raporlarda Gram boyanma özeliği ile gelen örneğin makroskopik görünümü önemlidir. Bazı anaerop bakterilerin 365 nm'lik ultraviyole (UV) ışığında floresans verme özelliği incelenir. Siyah renkteki nekrotik dokuların 365 nm'lik UV ışığında kırmızı renkte floresans vermesi, örnekte siyah pigment, anaerop bakterilerin varlığını gösterir (1, 4, 7, 14).

2.10.2. Mikroskopik inceleme

Gram boyama her örnekten hazırlanmalıdır. Gram boyama yöntemi ile karakteristik morfolojideki anaeroplara araştırılır. Gram boyamanın fiksasyon basamağında preparat, ısı yerine 30 saniye metanol ile fikse edilmelidir. Çünkü preparatların metanolla tespit edilmesi bakteri hücre morfolojisinin bozulmamasını ve daha iyi görünmesini sağlamaktadır. Zıt boyama için ise %0.5'lik bazik fuksin yerine safranin kullanılmalıdır. Eksüda ve kanlı sıvılardan hazırlanmış kalın tabakalı preparatlar akridin oranla boyandığında mikroorganizmalar daha iyi görülür. Gram boyamanın yanı sıra Giemsa ve Wright yöntemiyle boyalı preparatlar hazırlanabilir. Anaerop bakterilerin direkt mikroskopik incelenmesi için karanlık saha ve faz- kontrast mikroskopları da kullanılır. Bu şekilde yapılan incelemede:

1. *Dialister pneumosintes* gibi küçük ve iyi boyanmayan bakterilerin görülmesi,
2. *Campylobacter* cinsinin hareketinin incelenmesi,
3. *Clostridium* cinsinin sporlarının yerinin ve morfolojisinin incelenmesi,
4. Kültürü yapılamayan anaerop spiroketlerin morfolojilerinin gözlemlenmesi sağlanır.

Direkt makroskopik ve mikroskopik inceleme, primer ekim için besiyerlerinin seçilmesi konusunda mikrobiyoloji uzmanlarını

yönlendirmektedir (4, 7, 14).

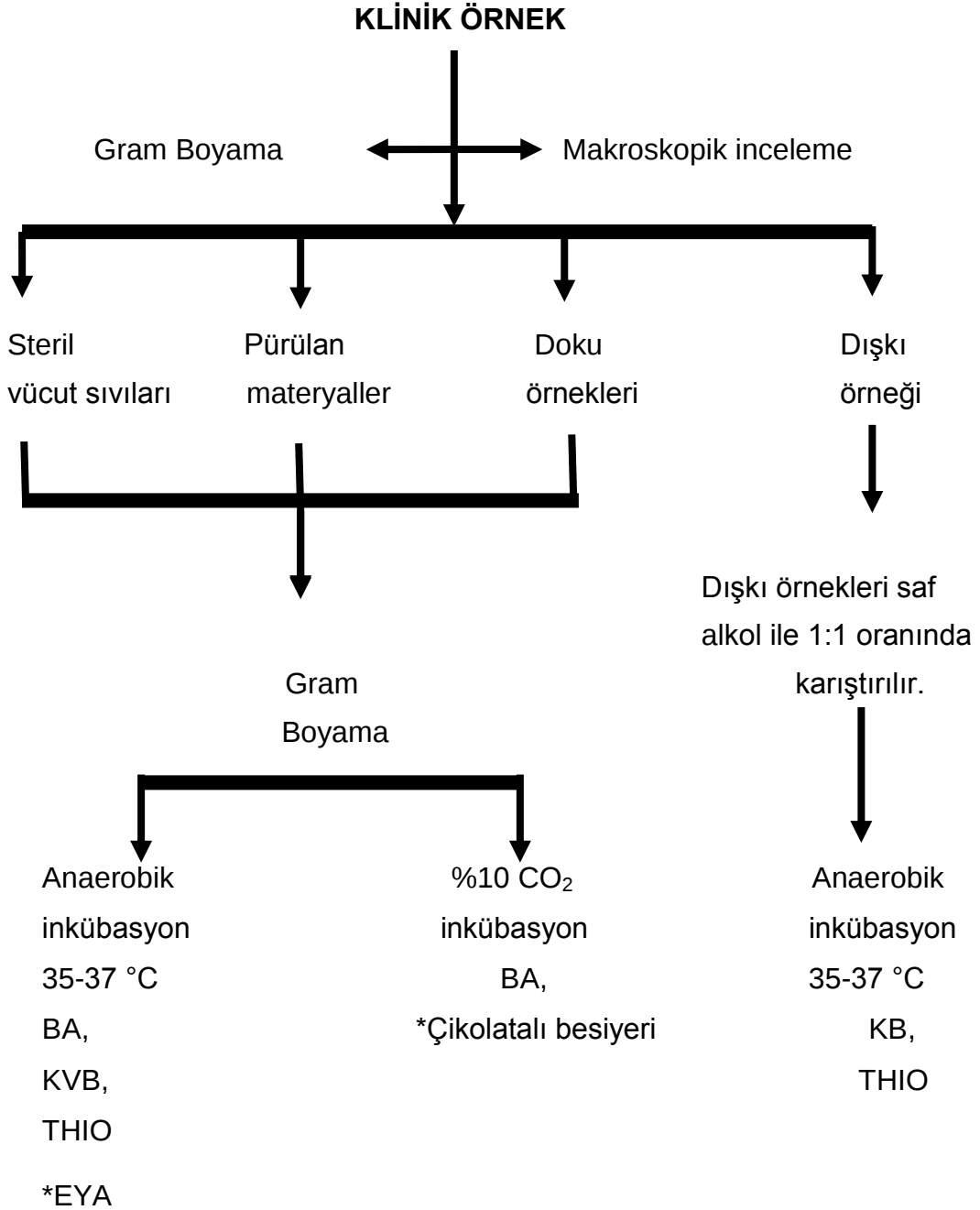
2.10. 3. Ekim ve İzolasyon için Algoritma

Anaerop bakteri enfeksiyonlarının polimikrobiyal olması, klinik materyalin endojen flora ile kontamine olabilmesi, örneğin oksijene maruz kalmadan hemen laboratuvara ulaştırılma gerekliliği, anaerop bakterilerin diğer bakterilere göre yavaş üremeleri, saf kültür üretimindeki zorluklar ve tanımlama testlerinin pahalı ve zaman alıcı olması anaerop kültür yöntemlerinin temel zorluklarıdır. Buna rağmen anaerop mikroorganizmaların tanısında esas olan, kültür için gelen örneğin vakit kaybetmeden ekiminin yapılmasıdır.

Laboratuvara gelen her örneğin %5 koyun kanı, vitamin K₁ (1 µg/mL) ve hemin (5 µg/mL) ile zenginleştirilmiş genel üretim besiyerlerine [CDC (Centers for Control Disease) anaerop kanlı agar, brucella agar gibi] ekimi yapılır. (1, 17). Gram boyama sonuçlarına göre uygun selektif besiyeri (KV kanlı agar gibi) seçilir. Örnekler geri dönüş sıvısına mutlaka işleme alınmalıdır. Ekimi yapılan plaklar 35-37°C' de 48 saat inkübe edilir. İnkübasyon anaerobik jarlarda veya anaerobik kabinde yapılır. Plaklarda üreme olmaması durumunda en az 5 gün inkübasyona devam edilir (1, 7, 17). Eğer *Clostridium* enfeksiyonundan şüpheleniliyorsa klinik örnek EYA'a (Egg yolk agar) ekilmelidir (17, 20). *C. difficile* için gelen dışkı örnekleri 1:1 oranında saf etanol ile 30 dakika oda sıcaklığında karıştırılmalıdır. Spor testi için dışkı örneklerinin ısı veya alkolle muamelesinden sonra CCFA'ya (Sikloserin-sefoksitin-fruktoz agar) pasajlarının yapılması *C. difficile*'nin izolasyon oranını arttırmaktadır (20). 48 saatlik inkübasyon sonrasında üreyen koloniler bir büyüteç veya stereoskopik mikroskopla incelenir (7). Plakta üreyen ve anaerop bakteri olduğundan şüphelenilen her bir koloninin iki ekim olacak şekilde subkültürü yapılır. Plaklardan biri anaerobik sistemde, diğeri CO₂'li ortamda inkübe edilerek aerotoleransına bakılır.

Klinik örneklerden bu kısma kadar yapılan makroskopik ve mikroskopik inceleme ile örneğin kültüre alınması işlemlerinin tamamına

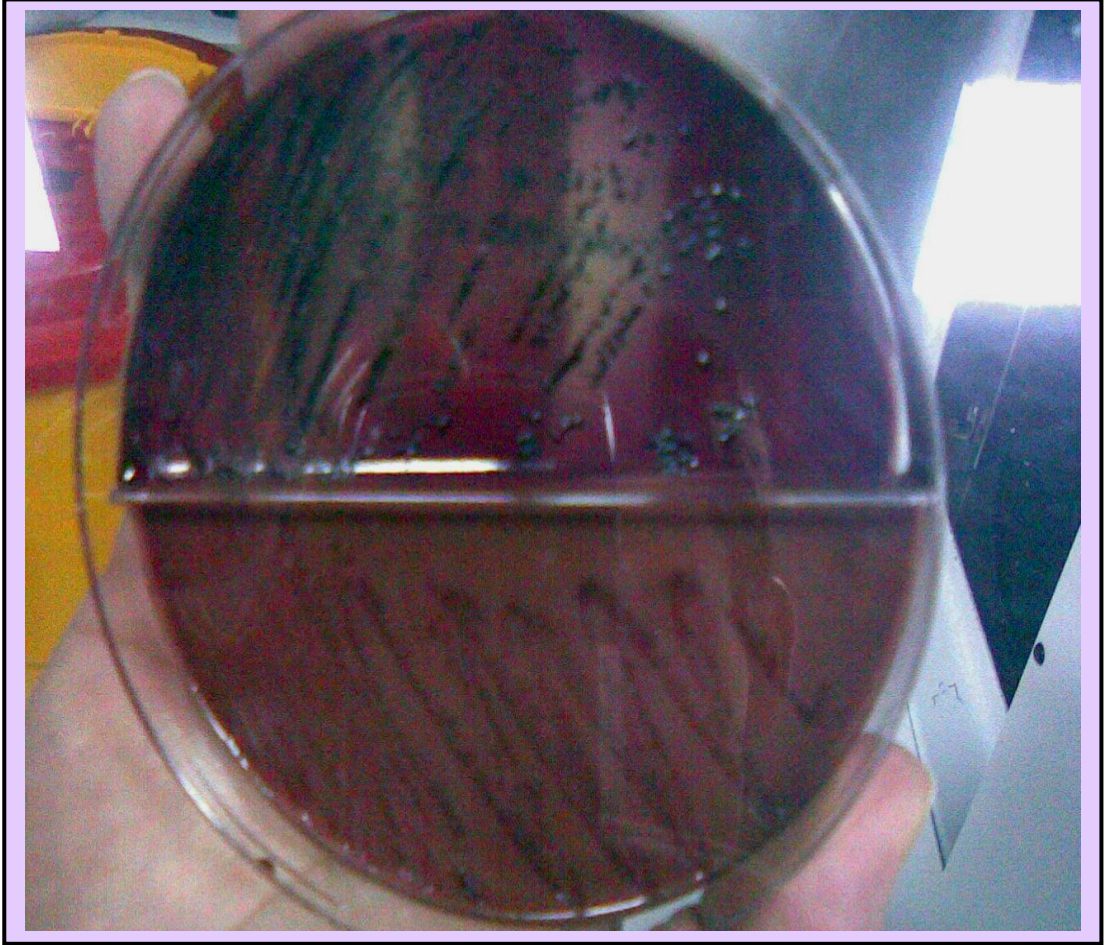
Seviye 1 tanımlama işlemleri denmektedir. Seviye 1 işlemleri aşağıda Şekil 2.1'de özetlenmiştir. Aerotolerans testi sonucu anaerop olduğu kesinleşen bakterilerin tanımlanması için bakteri Seviye 2 tanımlama testlerine alınır.



Şekil 2.1. Anaerop bakteriler için başlangıç identifikasyonu (Seviye 1) *:Klinik örnek ve Gram boyanma sonucuna göre; BA: %5 koyun kanı, vitamin K₁ (1 µg/ml) ve hemin (5 µg/ml) ile zenginleştirilmiş brucella kanlı agar; KVB: Kanamisin-vankomisin kanlı (hemolize olmuş) agar; EYA: Egg-yolk agar; THIO: vitamin K₁ ve hemin ile zenginleştirilmiş tiyoglikolatlı sıvı besi yeri; KB: Kanamisin kanlı agar (15).

İzole edilen bu bakteriler saf kültürleri elde edilerek daha ileri seviyede identifikasyonları yapılmak üzere bir başka ifade ile Seviye 3 testleri için referans laboratuvarlarına gönderilmelidir (17, 18).

Şekil 2.2. Kanlı-çikolatalı genel üretim besiyerinde pigment yapmış Gram-negatif anaerop basilin saf kültürü (Çalışmamızdan alınmıştır).



2.11. Anaerop Bakteri İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri

Anaerop kültürde klinik örnekler işleme alınırken seçici ve ayırt edici besiyerlerinin kullanılması, anaerop bakterilerin ayırt edici karakterleri ile (çift zonlu beta hemoliz, pigment oluşturma, alışılmadık koloni morfolojisi, Gram boyamada fusiform bakterilerin görülmesi gibi) hızlı tanımlaması ve florada karışık olarak bulunan fakültatif anaerop mikroorganizmalardan ayırt edilmesi

bakımından önem taşır (5, 13).

Anaerop kültürler için üç tip besiyeri önerilmektedir (13):

1. Selektif olmayan genel besiyerleri,
2. Selektif agar besiyerleri,
3. Geri dönüş sıvısı.

2.11.1. Selektif Olmayan Genel Üretim Agar Besiyerleri

Bu besiyerleri anaerop bakterilerin ilk izolasyonu için kullanılan besiyerleridir. İçeriği %5'lik koyun kanı, K₁ vitamini, hemin ve L-sistein ile zenginleştirilerek kullanılır. Bu besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan agar çeşidi belirli anaerop gruplarının üremesini arttırmak açısından farklılık gösterir. Bu nedenle izolasyon oranını en üst düzeye çıkarmak için en az iki farklı baz agar ile hazırlanan besiyerlerinin kullanılması tavsiye edilmektedir (7).

2.11.1.1. Anaerop kanlı agar (CDC)

Amaç: Anaerop kanlı agar anaerobik bakteriler için önerilen zenginleştirilmiş genel üretim besiyeridir. Bu besiyeri uygun anaerop koşullarda anaeroplardan ve aerop atmosferde ise pek çok bakterinin üretilmesi için uygundur .

Prensip: Bu non-selektif besiyeri, hassas anaerobik bakterilerin üremesini arttırmak için koyun kanı, L-sistein, vitamin K₁, hemin ve maya özü ile zenginleştirilmiştir.

İçeriği: Triptikaz veya triptik soy agar	15 gr.
Pepton	5 gr.
Sodyum klorid	5 gr.
Maya özü	5 gr.
Hemin	500 mg
Vitamin K ₁ (3-phytylmenadione)	10 mg.
L-sistein	400 mg.
Agar	20 gr.
Distile su	1000 ml.

Hazırlanışı: 1 gr. vitamin K₁ 99 ml. etanol içerisinde eritilerek stok vitamin K₁ solüsyonu (10 mg/ml) hazırlanır. Bundan 1 ml. besiyerine eklenir. Geri kalan stok solüsyon kahverengi steril şişelerde +4 °C'de saklanır. Hemin ve L-sistein her defasında 5 ml., 1 N NaOH içerisinde taze olarak hazırlanıp besiyerine ilave edilir. Tüm maddeler bu şekilde karıştırıldıktan sonra sıcak su banyosunda eritilir. Besiyeri pH'sı 7.5 olarak ayarlanır. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. Besiyeri 50 °C'ye kadar soğutulur ve içerisine 50 ml defibrine steril koyun kanı eklenir. Karıştırılıp petrilere dökülür. Plaklar +4 °C'de 6 hafta kadar saklanabilir.

Kalite kontrol: Besiyeri sterilite ve üreme yönünden incelemeye alınır. *F. necrophorum* ATCC 25286 ve *C. perfringes* ATCC 13124 kalite kontrol suşu olarak kullanılır (21).

2.11.1.2. Brucella kanlı agar (BA)

Amaç: Anaeroplara izolasyonu için kullanılır.

Prensip: Hassas anaerobik bakterilerin üremesini arttırmak için defibrine koyun kanı, hemin ve vitamin K₁ ilave edilen non selektif besiyeri haline getirilebilir.

İçeriği: Brucella broth	1000 ml.
Hemin stok solüsyonu	1 ml.
Vitamin K ₁ solüsyonu	1 ml.
Agar	2.5 gr.

Hazırlanışı: Önce vitamin K₁ ve hemin stok solüsyonları hazırlanır. Bunun için 0.2 ml. vitamin K₁ 20 ml. %95'lik etanol içinde çözülerek (10 mg/ml) kapaklı steril şişelerde soğukta ve ışıktan uzakta saklanır. Stok hemin solüsyonu (5 mg/ml) ise 0.5 gr. hemin 10 ml. 1N NaOH içinde çözülüp hacmi 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanır. Temel besiyeri sıcak su banyosunda ısıtılarak eritilir, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilir. 50 °C'ye kadar soğutulur. Temel besiyerine aseptik koşullarda %5 defibrine koyun kanı, 1 ml. vitamin K₁ ve 1 ml. hemin solüsyonu ilave edilir. Plaklara 20'şer ml olacak şekilde dağıtılır.

Kalite kontrol: Besiyeri sterilite ve üreme yönünden incelemeye alınır. *B. fragilis* ATCC 25285 ve *C. perfringes* ATCC 13124 kalite kontrol suşu olarak kullanılır (21, 22).

2.11.1.3. Schadler agar

Amaç: Anaerobik ve aerobik bakterilerin kültürü için kullanılan seçici olmayan besiyeridir.

İçeriği: Triptik soy broth	10 gr.
Pepton	5 gr.
Maya özü	5 gr.
Dekstroz	5 gr.
Tris (Hydromethyl Amino Methane)	3gr.
L-sistein	0.4 gr
Hemin	0.01 gr.
Agar	13.5 gr.

Hazırlanışı: 41,9 gr. içerik 1 litre distile suda tamamen çözülmesi için yavaşça ısıtılır. 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilir. Zenginleştirilmiş bir besiyeri isteniyorsa, besiyeri aseptik şartlarda 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra %5 defibrine koyun kanı eklenir ve karıştırılır.

Kalite kontrol: Besiyeri sterilite, inhibisyon ve biyokimyasal yanıt yönünden test edilir. Schadler agardaki *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 kalite kontrol suşu olarak kullanılır (21).

2.11.2. Selektif agar besiyerleri

Selektif olmayan besiyeri ile birlikte selektif besiyerlerinin kullanımı kültürün başarısını artırır. Örneklerin selektif olmayan bir agar ile birlikte tek bir selektif besiyerine ekilmesi anaeroplara üremesini %77'den %94'e çıkarmaktadır (7).

2.11.2.1. Kanamisin-vankomisin (KV) hemolize kanlı agar

Amaç: *Prevotella* ve *Bacteroides* türleri için seçici besiyeridir.

Prensip: Bu besiyeri, hassas anaerob bakterilerin üremesini arttırmak için

koyun kanı, L-sistein, vitamin K₁, hemin ve maya özü ile zenginleştirilmiş bir besiyeri olup gram olumlu ve olumsuz birçok bakteriyi baskılar. Kanamisin geniş spektrumlu bir aminoglikozid olup bakterilerde protein sentezini önler. Vankomisin ise dar spektrumlu bir antimikrobial olup hücre duvar sentezini engeller ve böylece gram negatif ve gram pozitif fakültatif anaerob bakterilerin inhibisyonu sağlanır. KV kanlı agar *Bacteriodes*, *Prevotella* ve bazı *Fusobacterium* türlerinin izolasyonunda ve belirlenmesinde önemlidir. KV kanlı agar, birçok *Prevotella* türlerinin üremesini ve hızlı bir şekilde pigmentasyonunu sağlar. Ancak vankomisin konsantrasyonu (7.5 µg/ml) çoğu *Porphyromonas* türlerinin üremesini inhibe eder. *Porphyromonas* sp. izolasyonu için vankomisin konsantrasyonu azaltılmış (2 µg/ml) besiyeri hazırlanabilmektedir (5, 7, 13, 14, 21).

İçeriği: Anaerob kanlı agar besiyeri ile aynıdır. İlaveten 1 litre besiyerine 100 mg. kanamisin ve 7.5 mg. vankomisin ilave edilir.

Hazırlanışı: Sterilizasyondan sonra 50 °C'ye kadar soğutulan besiyerine aseptik olarak %5 defibrine koyun kanı ve hazırlanan antibiyotikler ilave edilir, homojen olarak karıştırılır. Son pH 7.0 ± 0.2 olmalıdır. Plaklar petrilere dökülür ve soğumaya bırakılır. Nem kaybını önlemek için plaklar plastik torbalara yerleştirilir. Bu şekilde +4 °C'de 4 hafta kadar saklanabilir.

Kalite kontrol: Besiyeri sterilite, üreme ve inhibisyon yönünden incelenir. Bu maksatla kullanılan suşlardan *B. fragilis* ATCC 25285 besiyerinde ürediğinden pozitif kontrol olarak, *C. perfringens* ATCC 13124 ve *E. coli* ATCC 25922 üremediğinden negatif kontrol olarak kullanılır (21).

2.11.2.2. *Bacteroides safra eskülin (BBE) agar*

Amaç: *Bacteroides fragilis* grubu bakteriler ve *Bilophila* türleri için (*Bilophila wadsworthia*) seçici besiyeridir.

Prensip: BBE agar çeşitli enterik ve gram pozitif organizmaları inhibe eden gentamisin, %20 safra ve eskülin içerir. Bazı *B. vulgatus*, *B. stercoris*, *B. pyogenes* çomakları hariç *B. fragilis* grubu mikroorganizmalar eskülini hidrolize eder, böylece koloniler BBE agar üzerinde kahverengi-siyah haleli

siyah koloniler olarak görünürler. Koyu pigmentasyon, eskülinin bir hidrolitik ürünü olan eskületin ile ferik amonyum sitratın reaksiyonuna bağlıdır. Eskülini hidrolize edemeyen anaeroplara bu besiyerinde kahverengi-siyah pigmentli üreme göstermezler. *Bilophila wadsworthia* H₂S üretir ve siyah bir merkez etrafında soluk koloniler olarak görülür. Safra ise *Prevotella* türlerinin ve bazı anaerobik gram negatif çomakların inhibisyonunu sağlamaktadır (5, 7, 13, 14, 21, 24).

İçerik: Triptikaz veya triptik soy agar	15 gr.
Pepton	5 gr.
Oxgall	20 gr.
Eskülin	1 gr.
Ferrik amonyum sitrat	0.5 gr.
Hemin	10 mg.
Gentamisin	100 mg.
Sodyum klorid	5 gr.
Agar	15 gr.
Distile su	1000 ml.

veya,

Triptik soy agar	40 gr.
Oxgall	20 gr.
Eskülin	1 gr.
Ferrik amonyum sitrat	0.5 gr.
Hemin solusyonu (5 mg/ml)	2.0 ml.
Gentamisin solusyonu(40 mg/ml)	2.5 ml.
Distile su	1 lt.

Hazırlanışı: İçerik 1 litre distile suda çözülür, pH 7.0'ye ayarlanır, karışım kaynayana kadar ısıtılır. 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Plaklar petrilere dökülür ve soğumaya bırakılır. Nem kaybını önlemek için plaklar plastik torbalara yerleştirilir, +4 °C'de saklanır.

Kalite kontrol: Besiyeri sterilite ve biyokimyasal yanıt bakımından kontrol

edilir. Kontrol suşları olarak *B. fragillis* ATCC 25285 pozitif kontrol suşu, *F. necrophorum* ATCC 25286 ve *E. coli* ATCC 25922 ise negatif kontrol suşu olarak kullanılır (21).

2.11.2.3. Fenil-etil alkollü (PEA) agar

Amaç: Fakültatif gram negatif çomakların (daha çok Enterobacteriaceae familyası) inhibisyonunu sağladığı gibi çeşitli *Clostridium* türlerinin yayılmasını önleyen besiyerleridir.

Prensip: Enterik organizmalar ve *Proteus* türlerinin inhibisyonunu sağlar, ancak bazı zorunlu anaerop gram pozitif ve gram negatif anaeroplara gelişmelerine izin verir. Bu durum özellikle polimikrobiyal karışık örneklerin elde edildiği intra-abdominal enfeksiyonlarda önemlidir (7, 13, 14, 21, 24).

İçerik: Fenil-etil alkol agar	42.5 gr.
Vitamin K ₁ solüsyonu (10 mg/ ml)	1 ml.
Distile su	1000 ml.
Steril defibrine koyun kanı	50 ml.

Hazırlanışı: İçerik koyun kanı dışında karıştırılır, kaynayana kadar ısıtılarak çözülür. 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra koyun kanı ilave edilerek petrilere dökülür.

Kalite kontrol: Besiyeri sterilite, üreme ve inhibisyon yönünden incelenir. Besiyerinde *B. fragilis* ATCC 25285 suşları ürerken, *Proteus mirabilis* ATCC 12453 ve *E. coli* ATCC 25922 suşları üremez (21).

2.11.2.4. Yumurta sarılı agar (Egg yolk agar-EYA)

Amaç: Yumurta sarılı agar besiyeri, çeşitli aerop ve anaerop bakterileri lesitinaz, lipaz ve proteaz aktivitelerine göre ayırt etmede önerilen bir besiyeridir. Eğer klinik olarak veya Gram boyamada *Clostridium* enfeksiyonundan şüpheleniliyorsa, lesitinaz ve lipaz aktivitesine bakılmak suretiyle, bu besiyeri ile anaeroplara grup bazında hızlı identifikasyonu yapılır (5, 13, 14, 21).

Prensip: Bu besiyerinde kullanılan yumurta sarısına bağlı olarak üç majör enzimatik aktivite araştırılabilir. Lesitinaz aktivitesi, besiyerindeki üreme

bölgesinde opak bir zon olarak gözlemlenir. Lipaz aktivitesi, koloni yüzeyinde veya etrafında gökkuşağı tarzında bir parıltı oluşturmasıyla sonuçlanır. Proteaz aktivitesi ise besiyerinin etrafında ve üreme bölgesi dışına taşan saydamlık olarak gözlenir. Mikroorganizmalar bu aktivitelerden bir veya birkaçına sahip olabilirler

İçerik: Triptikaz	40 gr.
Monosodyum fosfat	1 gr.
Disodyum fosfat	5 gr.
Magnezyum sulfat	100 mg.
Sodyum klorid	2 gr.
Dekstroz	2 gr.
Hemin solusyonu(5 mg/ml)	1 ml.
Agar	20 gr.
Distile su	1 litre

Hazırlanışı: Temel besiyeri içeriği, pH'sı 7.6 olacak şekilde distile suda karıştırılarak ısıtılır. 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra laboratuvarında hazırlanmış 50-100 ml.'lik steril yumurta sarısı emülsiyonu ilave edilir, karıştırılır ve petrilere dökülür. Petrillerdeki fazla nemi almak için, kapakları hafif aralanarak soğumaya bırakılır. Plastik torbalara yerleştirilerek +4 °C'de saklanır.

Steril yumurta sarısı antibiyotiksiz yemle beslenen tavukların yumurtalarının deterjan ile fırçalanması ve %95'lik etil alkolde 1 saat bekletilmesiyle hazırlanır. Steril aletler kullanılarak kabuğu kırılan yumurtanın sarısı beyazından ve sarı kesesinden ayrılır. 500 ml. temel besiyeri (50 °C'ye kadar soğutulmuş) için 1 yumurta sarısı eklenir. Petri kutularına 20 ml. miktarlarında dökülür. *Clostridium* türleri için besiyerine otoklavlanmadan önce 100 mg/ml neomisin ilave edilir.

Kalite kontrol: Lesitinaz aktivitesi için *C. perfiringes* ATCC 13124 pozitif kontrol suşu olarak, *F. necrophorum* ATCC 25286 ise lipaz aktivitesi için pozitif kontrol suşu olarak kullanılır. *B. fragilis* ATCC 25285 EYA'da

üremesine rağmen proteolitik aktivite göstermediğinden negatif kontrol suşu olarak kullanılır.

2.11.2.5. Sikloserin-sefoksitin-fruktoz agar (CCFA)

Amaç: *C. difficile*'nin selektif izolasyonu için kullanılır (7, 13, 16, 19, 20).

Prensip: *C. difficile* kolonileri 366 nm UV ışığı altında CCFA üzerinde sarı-yeşil floresans verirler (20).

İçerik: Pepton	40 gr.
Disodyum fosfat	5 gr.
Monopotasyum fosfat	1 gr.
Fruktoz	6 gr.
Agar	20 gr.
Neutral red (%1 etanol içinde)	3 gr.
Distile su	1000 ml.
Sikloserin	500 mg.
Sefoksitin	16 mg.

Hazırlanışı: Sikloserin ve sefoksitin hariç temel besiyeri içeriği, son pH 7.6 olacak şekilde karıştırılır ve ısıtılır. 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir. 50 °C'ye kadar soğutularak sikloserin ve sefoksitin ilave edilir. Plaklara dökülür. +4 °C'de 8 hafta saklanabilir.

Kalite kontrol: Besiyeri sterilite, üreme ve inhibisyon yönünden incelenir. *C. difficile* ATCC 9689 suşu besiyerinde ürerken, *B. fragilis* ATCC 25285 ve *E. coli* ATCC 25922 suşları üremez (21).

2.11.3. Geri-dönüş sıvısı

2.11.3.1. Zenginleştirilmiş tioglikolat broth

Amaç: Çeşitli örneklerden aerobik ve anaerobik birçok bakteri türünün izolasyonu için tioglikolat broth, vitamin K₁, hemin ve serum gibi maddelerin ilavesiyle zenginleştirilir. Zayıf bir üreme olduğunda veya plağa ekilen örnekte az sayıda bakteri bulunduğunda, kültür için bakterilerin zenginleştirilmesini sağlayan geri-dönüş sıvısıdır (7, 21).

Prensip: Tioglikolat broth protein, glukoz, sodyum klorür, sodyum tioglikolat, indirgen maddeler ve agar içerir. Anaerobik bakterilerin izolasyonu için ek zenginleştirici maddelerin kullanımı tavsiye edilir. İlave edilen maddeler thioglycolate, L-sistein, sodyum sülfat ve agar, ortamın oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin düşüşüne ve sabit kalmasına katkıda bulunur. Bu durum birçok anaerob bakteri türünün gelişmesine izin verir.

İçerik: Maya ekstresi	5 gr.
Kasiton	15 gr.
Dekstroz	2.5 gr.
Sodyum klorür	2.5 gr.
Sodyum tioglikolat	0.5 gr.
L-sistein	0.5 gr.
Agar	0.75 gr.
Resazurin	0.001 gr.
Distile su	1 lt.

Hazırlanışı: 29.8 gram dehidrate besiyeri son pH 7.1 ± 0.2 olacak şekilde 1litre distile suda eritilerek ısıtılır. Tüplere 10 ml. olarak dağıtılır. 115 °C'de 15 dakika steril edilir. En iyi sonucu almak için, kullanmadan önce tioglikolat broth kaynatılır ve oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulur .

<u>İsteğe bağlı olarak eklenecek maddeler</u>	<u>Son konsantrasyonlar</u>
Vitamin K ₁	0.1mmg/ml
Sodyum bikarbonat	1 mg/ml.
Hemin	5 mm/ml.
Fare serumu ya da	%10 hacim/hacim
Fildes zenginleştirici	%5 hacim/hacim

Kalite kontrol: Besiyeri sterilite, üreme ve biyokimyasal yanıt yönünden incelenir. *B. fragilis* ATCC 25285 suşu pozitif kontrol olarak kullanılır (21).

2.11.3.2. Etli-glukozlu besiyeri

Amaç: *Clostridium* türlerinin izolasyonu için zenginleştirilmiş tioglikolat broth'un yerine alternatif olarak kullanılır (25).

İçerik: Kalp kasından hazırlanmış (yağı alınmış) kıyma	500 gr.
Distile su	1000 ml.
Sodyum hidroksit (1 N)	25 ml.
Triptikaz	30 gr.
Maya özeti	5 gr.
K ₂ HPO ₄	5 gr.
L-sistein	0.5 gr.
Hemin (%1 solüsyon)	0.5 ml.
K vitamini (%1 solüsyon)	0.1 ml.

Hazırlanışı: Karışım kaynatıldıktan sonra buzdolabında bir gece bekletilir. Yüzeyde oluşan yağ tabakası atılır. Gazlı bezden süzülür ve sıvı kısım bir kaba alınır. Distile su ile 1000 ml.'ye tamamlanır. Kıyma parçacıkları birkaç defa distile su ile yıkanarak sodyum hidroksit uzaklaştırılır. Ardından temiz gazlı bezler üzerine yaydırılarak kısmen durulanır. Diğer taraftan L-sistein dışındaki maddeler karıştırılıp eriyinceye kadar ısıtılır ve soğumaya bırakılır. Isısı 50 °C'ye gelince L-sistein ilave edilir. Yaklaşık 0.5 gr. kıyma 15x90 mm ölçülerindeki burgulu tüplere konur ve üzerine 7 ml. sıvı kısım eklenerek 121 °C'de 15 dakika steril edilir.

Kalite kontrol: Besiyeri sterilite, üreme ve biyokimyasal yanıt yönünden incelenir. *B. fragilis* ATCC 25285 suşu pozitif kontrol olarak kullanılır (21).

2.12. Anaerop kültür için kullanılan inkübasyon sistemleri

Anaeroplara bakteriyolojik incelenmesinde kullanılan çeşitli sistemler vardır ve bu sistemler %80-85 N₂, %5 H₂, %5-10 CO₂ gaz karışımlarından oluşmaktadırlar (7, 26).

2.12.1. Anaerop jar tekniği

%80-90 N₂, %5 H₂, %5-10 CO₂ gaz karışımı sağlayan bir sistem olup, su ile aktive olan veya susuz anaerop atmosfer sistemleri mevcuttur. Su

ile aktive olan sistemin çalışması için ortamda paladyum katalizör varlığı gereklidir. Kuru sistem katalizör gerektirmez (25).

2.12.2. Anaerop plastik poşet sistemi

Anaerop transport sistemlerinde anlatıldığı üzere, transport olarak da kullanılan bu poşetlerde CO₂ oranı genellikle %10'dan fazladır. Resazurin veya metilen mavisi indikatör stripleri ile ortamın atmosferik kontrolü yapılır. Plaklarda üremenin olup olmadığı poşet açılmaksızın yapılabilir (25).

2.12.3. Anaerobik kabin sistemi

%80-90 N₂, %5 H₂, %5-10 CO₂ atmosfer karışımından oluşan sistemlerdir. Anaerop kültür çalışmalarının her adımında (besiyeri hazırlama, kültür, inokülasyon, inkübasyon, identifikasyon ve antimikrobik duyarlılık çalışmaları) kullanılan ideal sistemlerdir. Ancak az sayıda kültürün yapıldığı laboratuvarlarda alternatif sistemler tercih edilmelidir (25).

Bu teknikler oksijene hassas, normal flora üyesi anaeroplara çalışmak için gereklidir. Bu teknikleri karşılaştırarak yapılan çalışmalar, klinik örneklerin uygun bir şekilde alınması, transportu ve laboratuvar tarafından uygun bir şekilde işleme alınması koşuluyla, anaerop bakterilerin diğer kompleks metodlara kıyasla anaerop jarlarda oldukça iyi ürediğini göstermiştir (26).

2.13. Kültürlerin inkübasyonu

Anaeroplara için uygun inkübasyon sıcaklığı 35-37°C' dir. Klinik örneklerin ilk olarak işleme alınması ve inkübasyonu, eğer mevcut ise anaerobik kabinde başlar (12). Eğer işlem anaerobik kabinde yapılmıyorsa, ekimi yapılmış besiyerlerinin uzun süre havaya maruz kalmasından kaçınılmalı ve ekim sonrası derhal anaerobik ortama kaldırılması gerekir. Ekimi yapılan besiyerleri mevcut anaerobik ortamda 48 saat inkübe edilmelidir (7, 13). İster anaerobik kabin, ister anaerobik jarlar olsun, anaerobik ortamın kalite kontrolü mutlaka yapılmalıdır (5). *Porphyromonas* türleri gibi yavaş üreyen anaeroplara için inkübasyon süresi 5-7 güne kadar

uzatılmalıdır (5, 7, 13). Kùltürler tiyolglükolat, etli glükozlu besiyeri gibi sıvı besiyelerine ekildiğinde, üreme takip edilmeli ve gözle görülür bir üreme olmadığı takdirde en az 5-7 gün bekletilmelidir. Böylece anaeroplara üreme oranı arttırılmış olur (7).

2.14. Kùltürlerin değeriendirilmesi

Kùltür plaklarında beş veya daha fazla sayıda değışik mikroorganizma üremesi görülüyorsa, bu bakterilere identifikasyon işlemleri yapmak klinisyene fayda sağlamayacağı için örneğin 'karışık flora' olarak yorumlanması uygun olacaktır. Ancak '*Bacteroides fragilis* grubu' gibi klinik öneme sahip ve dirençli bir izolat baskın olarak ürediğinde identifikasyonunu yapmak anlamlı olabilmektedir. İki veya ikiden fazla değışik anaerop bakteri üremesi varsa, bakterilerin subkùltürü yapılarak, zorunlu anaerop olup olmadıkları değeriendirilebilir ve gram boyamalarından yola çıkılarak 'anaerobik gram-pozitif basil' gibi kısmi identifikasyonları yapılabilmektedir. Ayrıca Gram boyamadaki karakteristik görünüm *Clostridium*, *Fusobacterium* türlerine işaret ediyorsa, bu durum ön rapora eklenmelidir. Tüm Gram negatif anaerop basillerin β -laktamaz testi yapılmalı, 'anaerop gram negatif basil, β -laktamaz pozitif veya negatif' şeklinde raporlanmalıdır. Bu şekilde yapılan kısmi raporlama dahi, karışık enfeksiyona neden olan anaeroplara tedavisinde klinisyene önemli ölçüde yol gösterici olacaktır (5).

Ayrıca kolonilerin incelenmesinde, ve koloni rengi ve morfolojisi, pigment oluşturmaları, UV ışığında floresan verme özellikleri, agarda çukurlaşma yapımları, hemoliz oluşturmaları ve kokuları da değeriendirilmelidir. Bu özelliklere göre yapılan değeriendirme kriterlerinden en önemlileri ve muhtemel tanıları Tablo 2.5'te belirtilmiştir.

Tablo 2.5. Anaerop bakterilerin koloni morfolojileri ve renkleri, pigment oluşturmaları, UV ışığında floresan verme özellikleri, agarda çukurlaşma yapıları, hemoliz oluşturmaları ve kokularına göre muhtemel tanıları (4).

ÖZELLİK	MUHEMEL ETKEN
Renk/pigment Kahverengi-siyah koloni Kırmızı, pembe, ten rengi, sarı	Gram-negatif çomak ise; <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Prevotella</i> spp. Gram-pozitif kok ise; <i>Peptococcus niger</i> Gram-pozitif çomak ise; <i>Actinomyces</i>
Yüzeyel Koloni (Şeffaf Koloni)	<i>Bacteroides ureolyticus</i> grubu
UV Işığında Floresans Verme Tuğla kırmızısı Kırmızı Açık yeşil	Gram-negatif çomak ise; <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Prevotella</i> spp. Gram-negatif kok ise; <i>Veillonella</i> sp. Gram-negatif çomak ise; <i>Fusobacterium nucleatum</i> Gram-pozitif çomak ise; <i>Clostridium difficile</i>
Agar Çukurlaştırma	<i>B. urealyticus</i> , <i>B. gracilis</i> , <i>Veillonella</i> spp.
Çift Zonlu Hemoliz	<i>Clostridium perfringens</i>
Çok fazla Yayılan Koloni	Terminal sporlu: <i>Clostridium tetani</i> Subterminal sporlu: <i>Clostridium septicum</i>
Koku At ahır kokusu Hoş olmayan tatlı kokusu	<i>C. difficile</i> Gram-pozitif kok ise; <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
Örümcek Ağı Benzeri Koloni	Gram-pozitif çomak ise; <i>Actinomyces israelii</i> 'nin genç kolonileri <i>Propionibacterium propionicum</i>
Azı Dişi Görünümlü Koloni	Gram-pozitif çomak ise; <i>A. israelii</i> 'nin yaşlı kolonileri <i>P. propionicum</i>
Beyaz, Ekmek Kırıntısı Görünümü	Gram-negatif çomak ise; <i>F. nucleatum</i>
Sahanda Yumurta Görünümü	Gram-negatif çomak ise; <i>Fusobacterium mortiferum</i> , <i>F. varium</i>
Buzlu Cam Görüntüsü	Gram-negatif çomak ise; <i>F. nucleatum</i>

2.15. Anaerop bakterilerin tanımlanması

Anaerop bakterilerin konvansiyonel identifikasyonları hem pahalı hem de zaman alıcı olduğundan, her laboratuvar maliyet etkinliği açısından değerlendirmelidir. Anaerop bakteri tanımlama testlerine göre Seviye 1, Seviye 2 ve Seviye 3 olmak üzere üç farklı seviyede laboratuvar tanımlanmıştır. Her mikrobiyoloji laboratuvarı anaerop bakteriyoloji çalışma sistemini maliyet-yarar ilişkisine göre farklı seviyelerde kurabilir(17, 18).

2.15.1. Seviye 1 tanımlama

Bu tanımlama düzeyi, anaerop bakterilerin saf olarak kültür ile izolasyonu, Gram boyanması, besiyerlerinde koloni morfolojilerinin incelenmesini içermektedir (14,17,18,19). Anaerop bakterilerin gram boyama ve besiyerlerindeki koloni morfolojilerine göre tanımlanması mümkün olsa da cins düzeyinde identifikasyonlarının yapılabilmesi için belli konsantrasyonda antibiyotik içeren disklerle tanımlanmasının yapılması gerekir (4).

2.15.2. Seviye 2 tanımlama

Seviye 1 düzeyindeki tanımlama işlemlerine ek olarak katalaz, indol ve nitrat reaksiyonu, safraya olan direnç gibi basit biyokimyasal testlerle anaerop bakterilerin seviye 2 düzeyinde tanımlamaları yapılır (1, 8, 14, 18, 19). Anaerop bakterilerin tanısında kullanılan testler arasında karbonhidrat fermantasyon reaksiyonları, katalaz, eskülin hidrolizi, nitrat redüktaz (nitrat disk testi), SPS (sodyum polyanetolsulfonat) disk testi, safrada üreme varlığı, üreaz testi, lesitinaz ve lipaz reaksiyonları, format fumarat (F / F) ile üremenin stimülasyonu testi, DNA-az araştırılması, jelatin hidrolizi, spor testi, hareket muayenesi, indol testi, toksin üretimi ve özel potense sahip antimikrobiyal disklerle duyarlılık sayılabilir. Anaerop bakterilerin özel potense sahip antibiyotik diskleri kullanılarak yapılan identifikasyonları Tablo 2.6'da verilmiştir.

Tablo 2.6. Özel potense sahip antibiyotik diskleri ile duyarlılıklara bakılarak yapılan tanımlama (4).

BELİRLİ POTANSİYELDEKİ ANTİBİYOTİK DİSKLERİ			
Mikroorganizma ismi	<u>Kanamisin</u> (1000 µg)	<u>Vankomisin</u> (5 µg)	<u>Kolitsin</u> (10 µg)
Gram pozitif anaeroplara	V	S*	R
<i>Bacteroides fragilis</i> grubu	R	R	R
<i>Bacteroides ureolyticus</i> grubu	S	R	S
<i>Fusobacterium</i> spp.	S	R	R
<i>Porphyromonas</i> spp.	R	S**	R
<i>Prevotella</i> spp.	R	R	V
Gram negatif anaerop koklar	S	R	S

* Bazı *Clostridium* cinsleri ve *Lactobacillus* cinsleri dirençli olabilir.

** *Porphyromonas* cinsi vankomisine duyarlı, fakat kolonileri UV ışığında floresans verir ve pigmentlidir.

2.15.3. Seviye 3 tanımlama

Son yıllarda yapılan çalışmalar, anaerobik enfeksiyonlarda enfeksiyon etkeni anaerop bakterilerin %50-75 kadarının identifikasyonunun yapılabildiğini, %27'sinin ise kesinlikle identifikasyonunun yapılamadığını göstermiştir (27). Bu durum anaerop bakterilerin konvansiyonel identifikasyonlarındaki güçlüklerden ve sürekli değişen taksonomik yeniliklerden kaynaklanmaktadır (27, 28, 29). Tüm bu belirtilen olumsuzlukların sonucunda son yıllarda anaerop enfeksiyonların rutin tanısında moleküler yöntemler de yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bugüne kadar anaerop bakterilerin doğru tanısının konulabilmesi için geliştirilen sistemlerden bazıları (18):

1. Küçültülmüş biyokimyasal sistemler (API, BBL Crystal Anaerobe, Sceptor Anaerobe)

2. Hızlı enzim belirleme panelleri (RapID ANAI, ANI Card-Vitek sistemi, Rapid ID 32A, API ZYM)
3. Enzim substratı taşıyan diskler (ROSC0 tablet)
4. Metabolik son ürünleri tespit eden analizler (gaz-sıvı kromatografisi, serbest yağ asidi analizleri, metil ester analizleri, sitotoksikite testleri)
5. Nükleik asit prob tekniği ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR)
6. Matrix-aracılı lazer desorpsiyon-kütle spektrofotometrisi (MALDI-TOF MS) dir (28, 30).

2.16. Anaerop bakterilerde duyarlılık test yöntemleri

Aerob bakterilere paralel olarak, anaerob bakteriler arasında da son 20-30 yıldır belirgin bir artış gösteren antimikrobiyal direnç söz konusudur (1, 31, 32, 33). Ancak anaerob bakterilerin duyarlılık testlerinin rutin olarak uygulanması; izolasyon ve tanımlanmalarındaki güçlükler kadar zor ve zaman alıcıdır (32, 33, 34, 35). Bundan dolayı anaerob antimikrobiyal duyarlılık testleri halen pek çok laboratuvar tarafından nadir olarak yapılmakta, dolayısıyla anaerob bakteriler için yapılan antimikrobiyal direnç çalışmalarının pek çoğu referans laboratuvarlar tarafından yapılan çalışmalarla kısıtlı kalmaktadır (31, 32). Yapılan antibiyotik duyarlılık çalışmaları lokal farklılıklar gösterebilmektedir (33). Bu yüzden toplumlarda ampirik tedaviye yön vermek amaçlı direnç profillerini belirlemek amacıyla bölgesel ve merkezi antibiyotik duyarlılık çalışmaları yapılmalıdır (6). Klinik izolat olarak anaerob bakterilerin duyarlılık testleri sıklıkla yapılmamaktadır (29), zaten rutin olarak yapılması “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” tarafından da önerilmemektedir (34, 35). Ancak CLSI şu durumlarda duyarlılık testlerinin yapılmasını önermektedir:

1. Virülansı yüksek bakteriler (*B. fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Porphyromonas*, *Prevotella* ve *Fusobacterium* spp. gibi) izole edilmesi (30),
2. Ampirik tedaviye cevap vermeyen enfeksiyonlar (6, 34, 36, 37),
3. Steril vücut sıvılarından anaerob bakteri izole edilmesi (1, 34, 36, 37),

4. Coğrafi bölgeler ve yerel hastanelere göre duyarlılıkların belirlenmesi amacıyla yapılan sörveyans çalışmaları (6, 34, 35).

Nitroimidazoller, imipenem, kloramfenikol, β -laktam- β -laktamaz inhibitörleri, penisilin, sefoksitin ve klindamisin, sefotetan antibiyotik duyarlılık çalışmalarında yer alması gereken başlıca antibiyotiklerdir (1, 34, 38). β -laktam- β -laktamaz inhibitörlerinden sadece ampisilin/sulbaktam in-vitro olarak tüm anaeroplara karşı etkilidir (33). Aminoglikozidler, trimetopirim-sulfametoksazol, birinci jenerasyon kinolonlar anaerop bakterilere etkisiz, florokinolonlar ise iyi etkili değildir (1).

2.16.1. Agar dilüsyon

CLSI M07-A8 (2009), 1 μ g/ml vitamin K₁, 5 μ g/ml hemin ve %5 hemolize koyun kanı ilavesiyle zenginleştirilmiş brucella agar kullanılarak yapılan agar dilüsyon yöntemini referans yöntem olarak belirtmiştir (36, 39, 40). Hazırlanan plaklara antimikrobiyal madde, stabil olmamasından dolayı (imipenem, klavulanik asit gibi) kullanılacağı zaman eklenmelidir. Bu yöntem pratik ve ekonomik olmamasına rağmen çeşitli laboratuvarların MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) değerlerinin doğru bir şekilde karşılaştırılmasına olanak vermektedir (36).

2.16.2. Broth mikrodilüsyon

CLSI M11-A7 (CLSI 2007)'de *B. fragilis* grubu bakteriler için tanımlanmış bir yöntemdir (36, 41). Hemin (5 μ g/ml), vitamin K₁, hemolize olmuş at kanı ile zenginleştirilerek hazırlanmış brucella broth kullanılır (36).

2.16.3. Broth disk elüsyon ve disk diffüzyon testi

Broth disk elüsyon ve disk diffüzyon testi, duyarlılık sonuçları referans yöntem olan agar dilüsyon ile korelasyon göstermediği için anaerop bakterilerde kullanılmamalıdır (36).

2.16.4. E-test

E-test yöntemi, broth ve agar dilüsyon yöntemlerinin sağladığı kesin kantitatif değerleri sağlayabilen, disk difüzyon yöntemi ile kombine edilmiş bir yöntem olup, uygulanabilirliği daha kolay, maliyet–etkin ve güvenilir sonuçlar

vereabilen bir yöntemdir (42).

Bazı *Clostridium* türlerinde E-test MİK değerlerinin sonucu, 48 saatlik inkübasyonla 24 saatlik inkübasyon karşılaştırıldığında fazla değişiklik göstermemektedir. Yavaş üreyen anaerop bakteriler ise 48 saatlik inkübasyon sonucunda iyi sonuç vermektedir. Ancak E-test sonuçlarının, agar dilüsyon testi sonuçlarına oranla, özellikle imipenem, metronidazol ve penisilin antibiyotiklerinde hafif düşüklük gösterme eğilimi vardır. Bu gibi hataları önlemek için, beta laktamaz pozitif izolatlarda penisilin duyarlılığına bakılmaması önerilmektedir. Klindamisinde ise, olası gecikmiş indüklenabilir direnci gözlemleyebilmek için E-test plaklarının 48 saatlik inkübasyonu gerekebilir. Bazı otoriteler E-testte yanlış metronidazol direncini önlemek için inokülasyondan 24 saat önce plakların anaerobik ortamda inkübe edilmesini önermektedir (39).

Anaerop bakterilerle yapılan çalışmalarda duyarlılık test yöntemlerine ait avantaj ve dezavantajlar ile çeşitli karşılaştırmalar Tablo 2.7 ve Tablo 2.8'de sunulmuştur (22).

TABLO 2.7. Anaerop bakterilerle yapılan çalışmalarda duyarlılık test yöntemlerine ait karşılaştırmalar

YÖNTEM	BESİYERİ	İNOKÜLÜM	İNKÜBASYON SÜRESİ (SAAT)
Agar dilüsyon	Zenginleştirilmiş Brucella kanlı agar	10^5 hücre/alan	48
Broth mikrodilüsyon	Zenginleştirilmiş Brucella broth	10^6 hücre/ml (10^5 / kuyucuk)	48
E test	Brucella kanlı agar	0.5 McFarland, eküvyonla besiyerine yayılır.	24-48

TABLO 2.8. Anaerop bakterilerle yapılan çalışmalarda duyarlılık test yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

YÖNTEM	AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
Agar dilüsyon	Referans yöntem. Çok sayıda izolat ve antibiyotik denenebilir.	Yoğun laboratuvar işlemleri. Pahalı yöntem
Broth mikrodilüsyon	Ekonomik, ticari paneller mevcut. Çok sayıda antibiyotik ve suş denenebilir.	Donmuş panellerin içindeki besiyeri miktarı az. Bazı cinsler iyi üremez.
E test	Kesin, doğru MİK değerleri. Nadir hasta izolatları için uygundur.	Sürveyans çalışmaları için pahalı

Duyarlılık test yöntemlerinde kullanılan kalite kontrol suşlarına ait bilgiler aşağıda verilmiştir.

1. *B. fragilis* ATCC 25285 (Kullanımı agar dilüsyon ile sınırlıdır.)
2. *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 (Kullanımı agar dilüsyon ile sınırlıdır.)
3. *C. difficile* ATCC 700057 (Kullanımı agar dilüsyon ile sınırlıdır.)
4. *Eggerthella lenta* ATCC 43055 (Agar dilüsyon, broth dilüsyon ve E-test yöntemlerinde kullanılabilir.) (36, 43).

2.17. Anaerop bakterilerde β -laktamaz aktivitesinin saptanması

Anaerop bakterilerin β -laktamaz enzimi üretimini araştırmak için, ticari olarak temin edilen, bir ucunda nitrosefin gibi kromojen bir sefalosporin süspansiyonu bulunan test çubukları kullanılmaktadır. β -laktamaz aktivitesi sonucu beta-laktam halkasının hidrolizi gerçekleşerek test çubuklarının ucu sarıdan kırmızıya dönüşür. Bu reaksiyon pozitif olarak değerlendirilir (34, 44). Bu reaksiyon 5-10 dakika içinde gerçekleşirken, bazı *Bacteroides* türleri için

30 dakika gerekebilir (36).

2.18. Anaerop bakterilerde antimikrobiyal direnç

Anaerop bakterilerde özellikle klindamisin, sefalosporinler, penisilin ve beta-laktam grubu antibiyotiklere dikkat çekici bir oranda direnç bildirilmeye başlanmıştır (33). Anaerop bakteriler arasında çeşitli ülkelerde yapılan duyarlılık çalışmalarında en yüksek direnç penisiline karşı bildirilmiştir (34).

B. fragilis grubu bakteriler klinik örneklerden en çok izole edilen bakteriler olduğu gibi, anaerop bakteriler arasında en çok antimikrobiyal direnç gösteren bakterilerdir (1, 24, 31, 32, 35, 45). Bu grup üyelerinin %95'inden fazlası penisilin ve ampisiline karşı direnç göstermektedir (1, 31). Ayrıca *B. fragilis* grubu bakterilerde klindamisin, geniş spektrumlu sefalosporinler ve sefamisin direnci dikkat çekici bir şekilde artmakta, son yıllarda ise metronidazole ve imipeneme dirençli suşlar ortaya çıkmaktadır (1, 24, 31, 33, 35). Piperasilin *B. fragilis* grubu anaeroplara etkisi oldukça iyi bilinen bir üreidopenisilin olmasına karşın, son 10 yılda bu antibiyotiğe olan duyarlılık %90'dan %70'e düşmüştür (36). Yine bu grup bakteriler penisiline %90, sefoksitine % 25, sefotetan ve üçüncü kuşak sefalosporinlere %30-85 oranında direnç göstermektedirler (45). Snyderman ve ark.ları *B. fragilis* grubu bakterilerle yaptıkları çalışmalarında karbapenemlere ve β -laktam/ β -laktamaz inhibitörlerine karşı oluşan direnci düşük bulmalarına rağmen, bu ajanlara karşı oluşan minimum inhibitör konsantrasyonundaki (MİK) dereceli artışa dikkat çekmektedirler (24, 36). Halen nadir olmakla birlikte, *B. fragilis* grubu bakterilerde metronidazol direnci 1978 yılından bu yana bildirilmeye başlanmıştır (33). Schapiro ve ark.ları (16) 2004 yılında bir *B. fragilis* izolatu (JC303) ile yaptıkları çalışmada metronidazol MİK değerini >256 μ g/ml olarak bulmuşlardır.

B. fragilis grubu bakterilerin aksine *Prevotella* türü bakterilerin yaklaşık %50'si penisilin G ve ampisiline karşı direnç göstermektedir. *Porphyromonas* türlerinde ise penisiline karşı olan antimikrobiyal dirence %8-%17 arasında değişen düşük bir oranda rastlanmaktadır. Her iki cinsin türlerinde

karbapenemlere, metronidazole, kloramfenikole ve β -laktam/ β -laktamaz inhibitör kombinasyonlarına direnç hemen hemen aynıdır. Buna rağmen klindamisin direnci *Prevotella* türleri arasında %0-11 arasında iken, *Porphyromonas* türlerinde %0-35 arasında görülmektedir (31).

Fusobacterium türleri arasında penisilin direncine nadir olarak rastlanmaktadır. Çeşitli β -laktamaz-negatif *Fusobacterium* türleri, farklı direnç mekanizmaları ile penisilin direnci gösterebilmektedir (33). *Fusobacterium* türlerinin %90'nından fazlası sefalosporinlere, sefoksitin, sefotetan ve seftizoksime gibi sefalosporinlere duyarlı iken, tetrasiklin direnci giderek artan bir oranda bildirilmeye başlanmıştır (31).

Bilophila wadsworthia, gastrointestinal sistemde sık rastlanan bir anaerop gram-negatif bakteri olup, %90'ı β -laktamaz üretimi ile penisilin, ampisilin, piperasilin ve seftizoksime dirençli iken, klindamisin, sefoksitin, β -laktam/ β -laktamaz inhibitör kombinasyonları, karbapenemler ve metronidazole duyarlıdır (31).

Actinomyces, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* türleri ve *Eubacterium* grubu anaerop sporsuz, gram pozitif basiller genellikle penisilinler, sefalosporinler, sefamisinler, karbapenemler ve β -laktam/ β -laktamaz inhibitör kombinasyonlarına duyarlıdır. *Lactobacillus* türlerinin sefalosporinlere karşı duyarlılıkları değişken olup, penisilin ile inhibe olurlar(31).

Anaerop sporlu gram-pozitif bakterilerden *Clostridium perfringens* penisilin dahil pek çok anaerobik antimikrobiyal ajana oldukça duyarlıdır. Bu türün dışında kalan *Clostridium difficile* ve diğer *Clostridium* türleri ise oldukça değişkenlik gösteren in-vitro duyarlılık gösterirler. *Clostridium perfringens* türleri dışındaki türlerde klindamisin ve β -laktam'lara karşı direnç görülmektedir. *Clostridium difficile* türünde klindamisin direnci oldukça yaygın karşımıza çıkmaktadır (33). Bu türde florokinolonlara karşı görülen direnç yeni bir potansiyel problem oluşturmaktadır (31).

Peptostreptococcus niger ile *Anaerococcus*, *Finnegoldia*, *Micromonas* ve *Peptoniphilus*, türleri β -laktam/ β -laktamaz inhibitör kombinasyonları,

sefalosporinler, karbapenemler ve kloramfenikole karşı duyarlı iken, penisiline %7-10, klindamisine %7-20 ve metronidazole ise %5-10 arasında değişen çeşitli antimikrobiyal direnç oranları göstermektedirler (31).

III - GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan besiyerleri, cihazlar, kitler

3.1.1. Brucella kanlı agar (BA)

Anaeroplara izolasyonu için temel besiyeri olarak kullanıldı. Anaerob bakteri üremesini arttırmak için defibrine koyun kanı, hemin ve vitamin K₁ ilave edildi.

İçeriği: Brucella broth	1000 ml.
Hemin stok solüsyonu	1 ml.
Vitamin K ₁ solüsyonu	1 ml.
Agar	2.5 gr.

Hazırlanışı: Önce vitamin K₁ ve hemin stok solüsyonları hazırlandı. Bunun için 0.2 gr. vitamin K₁ 20 ml. %95'lik etanol içinde çözülerek (10 mg/ml) kapaklı steril şişelerde soğukta ve ışıktan uzakta saklandı. Stok hemin solüsyonunu hazırlamak için ise 0.5 gr. hemin 10 ml. 1N NaOH içinde çözüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Temel besiyeri sıcak su banyosunda ısıtılarak eritildi ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. 50 °C'ye kadar soğutuldu. Temel besiyerine aseptik koşullarda %5 defibrine koyun kanı, 1 ml. vitamin K₁ ve 1 ml. hemin solüsyonu ilave edildi. Plaklara 20'şer ml olacak şekilde dağıtıldı ve kullanıma kadar 4-6 °C'de saklandı.

3.1.2. Zenginleştirilmiş tioglikolat besiyeri

İçerik: Triptikaz	15 gr.
Maya özeti	5 gr.
Dekstroz	5.5 gr.
L-sistein	0.5 gr.
Sodyum klorid	2,5 gr.
Sodyum tioglikolat	0.5 gr.
Resazurin	0.001 gr.

Agar

0.75 gr.

Hazırlanışı: 29,8 gram içerik, 1 ml. hemin solusyonu, 1ml. vitamin K₁ ve 1gr. sodyum bikarbonat 1 litre distile suda çözüldü ve final pH'ı 7.1 olarak ayarlandı. Eriyene kadar ısıtıldı (1 dakika). 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. 18 ml.'lik steril cam tüplere dağıtılarak, karanlık bir ortamda, oda ısısında muhafaza edildi.

3.1.3. Skim milk

Hazırlanışı: 250 ml. distile su içinde 25 gr. skim milk içeriği çözüldü. Ependorf tüplere 1 ml dağıtıldı. 121 °C'de 5 dakika otoklavlanarak steril edildi.

3.1.4. Anaerop kabin

Yaptığımız çalışmada anaerop kültür uygulamaları için Bactron IV Anaerobic/Environmental Chambers (Shellab, USA) kullanıldı.

Şekil 3.1. Anaerobik kabin (GATA Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Bakteriyoloji Laboratuvarı)



3.1.5. API 20A

Laboratuvarımızda mevcut olan API 20A (Anaerobe Phenotypic Identification, Bio-Merieux, France) yarı otomatize identifikasyon sistemi kullanılarak izole ettiğimiz anaerop bakterilerin cins ve tür bazında identifikasyonları yapılmıştır.

3.1.5.1. Gerekli malzemeler

API 20 A strip
İnkübasyon kutusu
Eküvyon
Pipet
Mini API System (BioMerieux, France).

3.1.5.2. Ayıraçlar

Brom Creosol Purple (BCP)
Ksilol (XYL)
Ehrlich's reaktifi (EHR)
API 20 A medium

3.1.6. β -laktamaz varlığının tespiti

İzole edilen her bakteri için β -laktamaz testi yapıldı. Bu test için kromojenik bir sefalosporin olan nitroferin çubukları (Oxoid, UK) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Çubuklardaki pembe rengin oluşumu sonucunda, test pozitif olarak değerlendirildi.

3.1.7. Katalaz testi

Kültürden alınan koloniler birkaç damla %15'lik H_2O_2 ile lam üzerinde muamele edilerek hava kabarcığı oluşturup oluşturmadığı gözlemlendi. Hava kabarcığının oluşması durumunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.Yöntem

3.2.1 Örneklerin toplanması

Klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin sıklığı ve bu mikroorganizmaların antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi konulu çalışmaya, 28.04.2011-01.04.2012 tarihleri arasında “GATA Askeri Tıp Fakültesi Eğitim Hastanesi’nde çeşitli klinik birimlerden anaerop kültür isteğiyle bakteriyoloji laboratuvarımıza gönderilen 345 rutin örnek alınmıştır. Çalışma için Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Etik Kurulu’ndan 01.11.2011 Tarih ve Y. ETİK KRL.: 1491-393-11/1539-271 sayılı karar ile onay alınmıştır. Alınan klinik örnekler laboratuvarımıza ulaştırıldıktan sonra, çalışmanın geriye kalan kısmı tümüyle GATA Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Bakteriyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın başlamasıyla birlikte hastanemizdeki pek çok klinikle (Diş kliniği, Deniz ve Sualtı Hekimliği, Genel Cerrahi kliniği, Yoğun Bakım kliniği, Ortopedi kliniği,) iletişime geçilerek çalışmamızın amacı anlatıldı. Anaerop bakteri kültür isteğiyle laboratuvarımıza gönderilecek olan numunelerin niteliği ve kabul edilebilirlik ölçüleri konusunda bilgi verilmiştir. Hastanemizde ticari olarak temin edilebilen anaerop transport sistemler mevcut olmadığından, bu kliniklere laboratuvarımız tarafından taze hazırlanan tioglikolat sıvı besiyeri verilmiş, anaerop örnek alımını takiben, örneğin vakit kaybedilmeden laboratuvarımıza ulaştırılması gerektiği hatırlatılmıştır. Ancak çalışmamız süresince kliniklerle arzu edilen boyutta bir işbirliği sağlanamamıştır.

3.2.2 Örneklerin işleme alınması

Ya steril cam tüplerle, ya steril plastik kaplarla ya da steril şırıngalarla laboratuvarımıza anaerop kültür için gönderilen tüm örneklerin öncelikle anaerop kültür için uygun örnek olup olmadıkları değerlendirildi. Uygun yöntemle alınmamış veya pamuklu svablarla alınmış anaerop kültür için uygun olmayan toplam 49 örnek kliniklere haber verilmek suretiyle işleme alınmadı. Bu örnekler Tablo 3.1’de verilmiştir.

Kalan 296 klinik örneğin makroskopik (örneklerin pürülan, kanlı

olması, kötü koku ve sülfür granülleri içermeleri gibi.) özellikleri ile gram boyanma özellikleri değerlendirildi. Gram boyamalarda anaerob bakteriler tipik morfolojik özellikleri, pleomorfik boyanma özellikleri ve spor içerip içermemeleri yönünden incelendikten sonra örnekler primer kültür plaklarına ekildi.

3.2.3.Kültür

Uygun olan örneklerin anaerob ve aerob kültür için brucella kanlı agar, % 5 koyun kanlı agar, EMB (Eozin Metilen Blue) agar ve çikolatamsı agara ekimleri yapıldı. Ayrıca örneklerin %1 hemin ve vitamin K₁ ile zenginleştirilmiş, geri dönüş sıvısı için kullanılan tioglikolatlı buyyona (Fluid thioglycollate medium, Acumedia, USA) ekimleri yapıldı. En iyi sonucu alabilmek için tioglikolatlı buyyon kullanılmadan önce ısıtıldı ve oda ısısına gelmesi bekledi. Anaerob kültür için kullanılan brucella agar plakları anaerob kabinde en az 24 saat (Bactron IV Anaerobic/Environmental Chambers, USA) inkübe edilerek indirildi.

Kabin içi anaerobik atmosferi sağlamak için karışım tüpü kullanıldı. Gaz karışım oranları %5 H₂, %5 CO₂ ve %90 N₂ olarak belirlendi. Yükleme odasına örnekler yerleştirdi. Kontrol paneli üzerinde bulunan Gas/VAC anahtarı VAC konumuna alınarak basıncın 17-20 mmHg atmosferine ulaşması sağlandıktan sonra GAS/VAC anahtarı GAS konumuna alındı ve gösterge 4 mmHg basınç seviyesine ulaşana kadar gaz verildi. Bu işlem en az üç defa uygulandı ve en sonunda basınç göstergesi 0 mmHg seviyesine ulaşana kadar tekrar edildi. Kollar eldiven içerisine sokuldu. Ayakla 'vakum' pedalına basılarak, kollar eldivenlerin içerisinde iken vakumu alındı. Gaz pedalına basarak içeriye gaz verildi. Bu işlem en az üç kez tekrarlandı. Kabindeki eldiven kapakları açıldı. İçerideki yükleme odasının kapağı açılarak malzeme ve örnekler yükleme tepsisi ile kabine alındı. Anaerob ekimler yapıldı. Kültür plakları 35-37 °C'de en az 48 saat inkübe edildi. Kabinden çıkmadan önce 'gaz' ayak pedalına basıldı, eldivenlere gaz verilerek geriye

doğru çekildi. Kabinden çıkmadan önce gaz akışı devam ederken kapaklar kapatıldı.

Tablo 3.1. Anaerop kültür için değerlendirmeye alınan örnekler ve anaerop bakteri izolasyon oranları

Örnek Tipi	Örnek Sayısı	İşleme Alınmayan Örnek Sayısı	İzole edilen Anaerop Bakteri Sayısı	İzolasyon Oranı (%)
Doku Kültürü	49	10	2	5
Safra Sıvısı	12		1	8
Kemik İliği	6			
Plevra Sıvısı	46		3	6
BOS	16			
Suprapubik İdrar	28	27		
Kuldosentez Sıvısı	2			
Parasentez Sıvısı	13			
Perikard Sıvısı	21			
Sinüs Aspirat Sıvısı	5			
Yara Aspirasyon Sıvısı	27	8	2	10
Transtrakeal Aspirasyon Sıvısı	6		1	16
Vitreus Sıvısı	6	4		
Bronkoalveolar Lavaj Sıvısı	4			
Eklem Sıvısı	16		1	6
Sinoviyal Sıvı	9			
Amniyon Sıvısı	1			
Apse Aspirat Sıvısı	74		16	21
Torasentez Sıvısı	4			
Toplam	345	49		

3.2.4 İzole edilen mikroorganizmaların tanımlanması

İnkübasyon sonunda karışık üreme olan plaklar tek koloni düşecek tarzda subkültüre edildi. Anerop plağında üreme olmadığı halde gram boyasında mikroorganizma görülen tüm örneklerin THIO geri dönüş sıvısından tekrar anaerop ekimi yapıldı. Anaerop ekim plaklarında üreme olmaması durumunda, geç üreyen anaerop bakteriler için inkübasyon süresi 5-7 gün kadar uzatıldı. İnkübasyon sonrası anaerop ortamda üreyen şüpheli tüm koloniler çikolatamsı agarlara ekilip, hem CO₂'li etüvde, hem de anaerop kabinin inkübatöründe 48 saat inkübe edildi. Aerop ortamda üremeyip, anaerop kabinde üreyen (Aerotolerans testi pozitif olan) tüm izolatlar anaerop bakteri olarak değerlendirildi. İzole ettiğimiz anaerop bakterilerin biyokimyasal identifikasyonu için laboratuvarımızda mevcut olan API 20A (Anaerobe Phenotypic Identification, Bio-Merieux, France) yarı otomatize identifikasyon sistemi kullanıldı. Bu işlem için anaerop ortamdan elde edilmiş 24 saatlik taze kültürden eküvyonla bakteri toplandı. API süspansiyon mediumda Mc Farland 3 bulanıklık ayarı yapıldı. İnkübasyon kutusunun kapak kısımları 10 ml. distile su ile doldurularak nemli ortam sağlandı. GEL (jelatin) testi için kuyucuk tamamen doldurulurken, IND-ARA (indol-arabinoz) kısmına kadar yarım bakteri süspansiyonu koyuldu. IND kısmına buharlaşmayı engellemek için mineral yağ damlatıldı. İnkübasyon kutusunun kapağı kapatılarak 37 °C'de 24 saat anaerobik kabinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara ayıraçlar damlatılarak biyokimyasal analizi yapıldı. IND kuyucuğuna 1 damla ksilol ve 2-3 dakika sonra 1damla Erlich reaktifi damlatıldı. Kırmızı renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak değerlendirilirken renk oluşmaması negatif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Glukoz-arabinoz aralığına 1 damla Brom Creosol Purple reaktifi damlatılması sonucunda sarı/sarı-yeşil renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Gliserol-trehaloz aralığına 1 damla Brom Creosol Purple reaktifi damlatıldı, sarı/sarı-yeşil renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Reaksiyon sonuçları Mini API cihazındaki veri tabanına girilerek bakterilerin tanımlanması yapıldı.

Tüm anaerop izolatlar, % 20 oranında kaymağı alınmış süt tozu besiyeri

(Skim milk powder, Oxoid, UK) içerisinde -70°C'de saklanmıştır (46).

Şekil 3.2. API 20A ile yapılan anaerop bakteri identifikasyonu (Çalışmamızdan alınmıştır.).



3.2.5. İzole edilen anaerop bakterilerde antimikrobiyal direncin belirlenmesi

Çalışmamızda, izole edilen bakterilerin antimikrobiyal direncini belirlemek için sefoksitin (Sigma, USA), kloramfenikol (Sigma, USA), metronidazole (Sigma, USA), penisilin G (Sigma, USA) ve klindamisin (Sigma, USA) antibiyotikleri ve CLSI M100-S18 (2008)'in referans yöntem olarak kabul ettiği agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır (47).

3.2.6. Agar dilüsyon için kullanılan besiyerinin hazırlanması

CLSI'nın önerdiği doğrultuda vitamin K₁ (10 mg/mL) ve hemin (5 mg/ml) ile zenginleştirilmiş brucella kanlı agar (Mast, UK) besiyeri kullanıldı. Brucella kanlı agar, otoklavlanmadan önce hemin ve vitamin K₁ ilave edildi. Otoklav ile sterilize edildikten sonra 48-50 °C'ye soğutuldu ve bir litrelik besiyerine 50 ml dondurulup çözündürülmüş (hemolize) koyun kanı ilavesi ile zenginleştirme yapıldı (22, 40). Agar dilüsyon yapılmak üzere plaklara, hazırlanan besiyerinden kalınlığı 4 mm olacak şekilde 18 ml., konsantrasyonu belli antimikrobiyal solüsyonlardan 2ml olacak şekilde, aynı gün içinde döküldü.

3.2.7. Antimikrobik ilaçların stok çözeltilerinin hazırlanması

Antibiyotiklerin seri dilüsyonları CLSI M100-S18 (2008)'de belirttiği sulandırım şemasına göre hazırlandı (47). Bunun için kullanılan antimikrobik

ilaçların potens değerleri üretici firma ile görüşülerek alınmıştır. Antimikrobik ilaçların potens değerleri ile CLSI'nın belirttiği antimikrobiklerin çözücü ve sulandırıcıları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Antimikrobik ilaçların stok çözeltilerinin hazırlanması için gerekli çözücüler, sulandırıcılar ve bu antimikrobiklerin potens değerleri (47).

KULLANILAN ANTİMİKROBİK İLAÇ	ÇÖZÜCÜ	SULANDIRICI	POTENS DEĞERLERİ
Klindamisin	Su	-	1 µg/ml
Kloramfenikol	%95 etanol	Su	25 µg/ml
Metronidazol	DMSO	Su	1 µg/ml
Penisilin G	Su	-	1215 ünite/mg
Sefoksitin	Su	-	934 µg/mg

Bütün antimikrobiyal ilaçlar için stok çözeltileri 5120 µg/ml. olacak şekilde hazırlandı. Bunun için CLSI tarafından önerilen formüller kullanıldı (48). Bu formüller tartılacak olan ağırlığa ya da hacme göre hazırlandı:

$$\text{Hacim (ml.)} = \frac{\text{Ağırlık (mg.)} \times \text{Antimikrobiyal Potensi}}{\text{İstenen Konsantrasyon (µg/ml)}}$$

$$\text{Ağırlık (mg.)} = \frac{\text{Hacim (ml.)} \times \text{İstenen Konsantrasyon (µg/ml)}}{\text{Antimikrobiyal Potensi}}$$

Tüm stok solüsyonları 50 ml. olacak şekilde hazırlandı. Buna göre yukarıdaki formül kullanılarak tartılacak antimikrobiyal miktarı belirlendi ve Tablo 3.2’de belirtilen çözücüler ile hazırlanan solüsyon steril tüplere 10’ar mililitre paylaştırılarak kullanılıncaya kadar –20°C’de saklandı. Agar dilüsyon yapılacağı zaman, çözülen stok solüsyonundan 1’den 12’ye kadar numaralandırılan cam tüplerin ilk üç tüpüne sırasıyla 2, 1, 1 ml olacak şekilde antimikrobiyal madde dağıtıldı. Sulandırıcılar ise sırasıyla ilk üç tüpe 2, 3, 7 ml olacak şekilde ilave edildi. Daha sonra üç numaralı tüpten 4, 5 ve 6 numaralı tüplere sırasıyla 2, 1, 1 ml antimikrobiyal çözelti dağıtıldı ve bu tüplere sırasıyla 2, 3, 7 ml sulandırıcı ilave edildi. Altıncı tüpten 7, 8 ve 9 numaralı tüplere sırasıyla 2, 1, 1 ml antimikrobiyal dağıtıldı ve bu tüplere sırasıyla 2, 3, 7 ml sulandırıcı ilave edildi. Son olarak dokuzuncu tüpten 10, 11 ve 12 numaralı tüplere sırasıyla 2, 1, 1 ml antimikrobiyal dağıtıldı ve bu tüplere sırasıyla 2, 3, 7 ml sulandırıcı ilave edildi. Yukarıda belirtilen sulandırıcılar Tablo 3.2’ de belirtilmiştir. Böylece tüm antimikrobiyaller için 5120 ile 1.25 µg/ml.’lik ara konsantrasyona sahip 13 antimikrobiyal solüsyon oluşturuldu. Bu hazırlanan çözeltilerden alınan 2 ml.’lik antimikrobiyal solüsyon, 18 ml dökülmüş olan besiyeri plakları ile karıştırıldığında 1:10 sulandırıldı ve son konsantrasyon 512 ile 0.125 µg/ml. olarak hazırlandı.

3.2.8. Bakteri inokulumunun hazırlanması

Saklanan tüm anaerop izolatlar canlandırma için Brucella kanlı agar besiyerine ekildi. Anaerobik ortamda 24-48 saatlik inkübasyona bırakıldı. Canlandırılan izolatlar subkültürü yapıldıktan sonra spektrofotometre kullanılarak (BD Phoenix, Spectro., USA) tioglikolatlı buyyon içerisinde 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml.) bulanıklık standartına getirildi. Mikroorganizmaların süspansiyonları, antimikrobiyal maddenin en düşük olduğu petriden başlamak koşulu ile, incelenen her bir bakteri için petri üzerinde bölünmüş karelere 5 µl olacak şekilde inoküle edildi.

3.2.9. Ekim ve değerlendirme

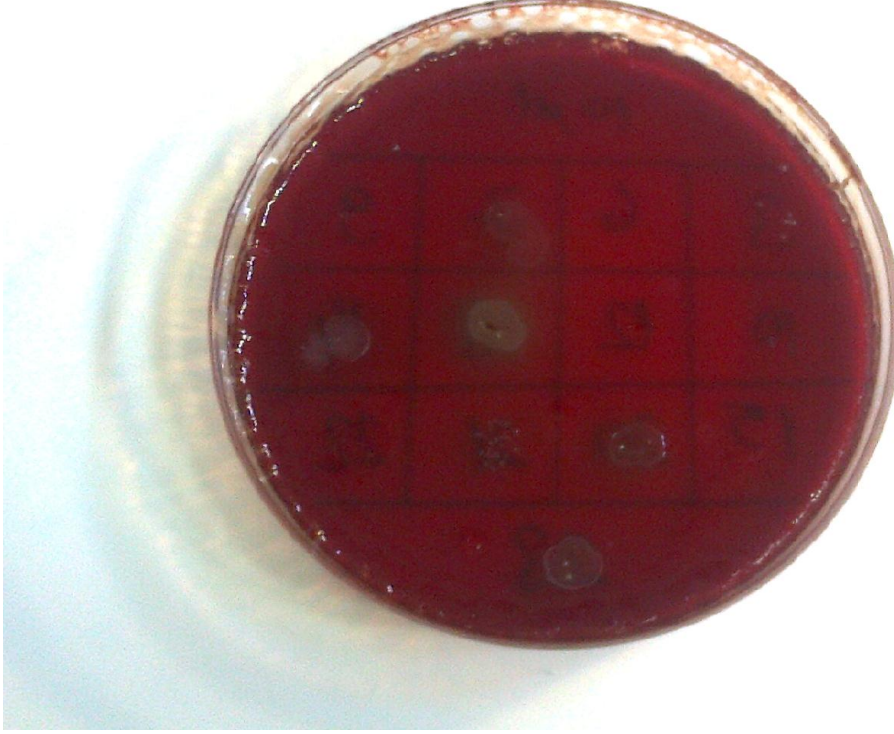
Antimikrobiyal solüsyonlu Brucella kanlı agar besiyerine 5 µl. bakteri süspansiyonu inoküle edildi. Daha sonra anaerobik kabinde 35-37°C’de 48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda üremenin gözlenmediği en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonu MİK olarak değerlendirildi. İnokulum bırakılmasına bağlı izler ile tek bir koloni şeklinde üremeler dikkate alınmadı. Duyarlılık yönünden CLSI M100-S21 (2011)’de belirtilen MİK kriterlerine göre yorumlandı (43). Değerlendirmesi yapılmış bir agar dilüsyon plağı şekil 3.3’te belirtilmiştir.

Tablo 3.3. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Referans Aralıkları (µg/ml)(43)

<u>ANTİMİKROBİYAL MADDE</u>	<u>MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONU (MİK)</u>		
	<u>R</u>	<u>I</u>	<u>S</u>
Kloramfenikol	≤8	16	≥32
Penisilin G	≤0.5	1	≥2
Metronidazol	≤8	16	≥32
Klindamisin	≤2	4	≥8
Sefoksitin	≤16	32	≥64

R: dirençli, I: orta duyarlı, S: duyarlı

Şekil 3.3. Agar dilüsyon yapılmış antibiyogram plağı (Çalışmamızdan alınmıştır).



3.2.10. Sonuçların yorumlanması

Agar dilüsyon petrilerinde üremenin inhibe edildiği son konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak değerlendirildi. Buna göre CLSI (2011) referans aralıklarına göre bakteriler dirençli/duyarlı olarak belirlendi. (43).

IV-BULGULAR

Laboratuvarımıza anaerop bakteri kültür isteği ile gelen 345 örneğin 49'u reddetme kriterlerine göre kabul edilmedi. İşleme alınan 296 klinik örnekten 26 anaerop bakteri (%8.8) izole edildi. Bu izolatların 14'ü sporsuz anaerop Gram negatif basil, 7'si anaerop Gram pozitif basil, 5'i ise Anaerop Gram pozitif kok olarak tanımlanmıştır. 26 izolattan 18'inin identifikasyonu API 20A ile yapılabilirken, 8'inin tanımlanması yapılamadı. Bu 8 izolatın tanımlanması, gram boyama düzeyinde rapor edilerek kliniklere bildirildi. İzole edilen bakteriler ve klinik örnek tipleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Agar dilüsyon yapılmadan önce -70 °C'de stoklanan bakteriler anaerop kabin içerisinde canlandırıldı. Bakterilerin Brucella kanlı agara pasajları yapılarak, kabin içerisinde 48 saat inkübasyonu yapıldı. Üreme olmayan plakların inkübasyonu 5-7 güne kadar uzatıldı. Pasajı yapılan 26 bakterinin 11'i plaklarda üredi. Dolayısıyla, çalışmamızda ancak 11 anaerop bakteri için agar dilüsyon duyarlılık testi yapılabilmiştir. Anaerop bakteri üremesi olan bu 11 klinik örneğin 10 tanesinde β -laktamaz varlığına rastlanırken, yalnızca 1 tanesinde (*P. acnes*) β -laktamaz varlığına rastlanmadı. Agar dilüsyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal duyarlılıkları belirlenen anaerop bakterilerin MİK değerleri aşağıda Tablo 4.2'de verilmiştir

Tablo 4.1. Klinik örnek tiplerine göre izole edilen bakteriler

İZOLE EDİLEN BAKTERİLER		
Klinik Örnek	Anaerop Bakteriler	Aerop Bakteriler
Apse (n=16)	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>E. coli</i>
	<i>Prevotella intermedia/disiens</i>	-
	*Anaerop gram-pozitif kok <i>Bacteroides ureolyticus</i>	-
	*Gram-negatif anaerop basil *Gram-pozitif anaerop kok	<i>E. coli</i>
	*Gram-pozitif anaerop kok	<i>E. coli</i>
	<i>Bacteroides distasonis</i>	-
	<i>Lactobacillus acid/jense</i>	-
	<i>Prevotella intermedia</i>	-
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	-
	<i>Prevotella</i> sp.	-
	<i>Bacteroides fragilis</i>	-
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Streptococcus anginosus</i>
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	-
	<i>Peptostreptococcus</i> sp.	<i>Eikenella corrodens</i>
Cerrahi yara (n=1)	*Anaerop gram-pozitif basil	-
Doku (n=2)	<i>Porphyromonas assaccarolytica</i>	<i>E. coli</i>
	*Anaerop gram-negatif basil	<i>Streptococcus anginosus</i>
Eklem sıvısı (n=1)	<i>Propionibacterium acnes</i>	-
Plevra (n=3)	<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Streptococcus viridans</i>
	<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>	-
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	-
Safra sıvısı (n=1)	*Anaerop gram-pozitif kok	<i>Enterococcus</i> sp.
		<i>E. coli</i>
		<i>K. oxytoca</i>
TTA (n=2)	*Anaerop gram-negatif basil	-
	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	<i>S. aureus</i>

*: İdentifikasyonu yapılamayıp, gram boyamasına göre sonucu kliniğe bildirilen anaerop bakteriler.

Tablo 4.2. Agar dilüsyon yapılarak MİK değerleri belirlenen anaerop bakteriler ve β -laktamaz sonuçları

KULLANILAN ANTİMİKROBİYAL MADDELER VE AGAR DİLÜSYON SONUÇLARI ($\mu\text{g/ml}$)							
İzole edilen bakteri	Örnek tipi	Kloramfenikol (C)	Penisilin G (PG)	Metronidazol (M)	Klindamisin (Da)	Sefoksitin (FOX)	β -laktamaz sonucu
<i>Porphyromonas assaccharolytica</i>	Doku	< 0.125 (S)	2 (R)	< 0.125 (S)	< 0.125 (S)	< 0.125 (S)	+
* <i>Bacteroides fragilis</i>	Apse	< 0.125 (S)	128 (R)	32 (R)	16 (R)	16 (S)	+
* <i>Bacteroides fragilis</i>	Apse	< 0.125 (S)	2 (R)	4 (S)	16 (R)	64 (R)	+
<i>Prevotella intermedia/disiens</i>	Apse	< 0.125 (S)	2 (R)	< 0.125 (S)	< 0.125 (S)	< 0.125 (S)	+
* <i>Bifidobacterium</i> sp.	Plevra sıvısı	< 0.125 (S)	2 (R)	16 (I)	0.25 (S)	0.25 (S)	+
* <i>Bifidobacterium</i> spp. (n=2)	Apse	< 0.125 (S)	2 (R)	< 0.125 (S)	< 0.125 (S)	< 0.125 (S)	+
* <i>Bifidobacterium</i> sp.	Apse	< 0.125 (S)	2 (R)	4 (S)	4 (I)	32 (I)	+
<i>Propionibacterium acnes</i>	Plevra Sıvısı	< 0.125 (S)	< 0.125 (S)	512 (R)	0.2 (S)	0.5 (S)	-
<i>Prevotella intermedia</i>	Apse	< 0.125 (S)	> 512 (R)	4 (S)	16 (R)	64 (R)	+
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	TTA	< 0.125 (S)	2 (R)	< 0.125 (S)	< 0.125 (S)	< 0.125 (S)	+

S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R: Dirençli, n: izolat sayısı

* : Antibiyotik duyarlılıkları farklı olduğu için, aynı izolatlar ayrı olarak tabloda belirtilmiştir.

V-TARTIŞMA VE SONUÇ

Anaerop bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonlar çoğunlukla mikst enfeksiyonlar şeklinde olup, ağır tablolar şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Bu durum, ağır seyreden enfeksiyon tablosu karşısında, etken olduğu düşünülen bakterilerin antimikrobiyal maddelere olan duyarlılıklarının saptanmasını gerekli kılmaktadır (49). Ancak anaerop bakterilerin rutin antibiyotik duyarlılık çalışmalarının yapılması oldukça zahmetli ve zaman alıcı olduğu için klinisyenler daha çok ampirik tedaviye yönelmekte, bu da günümüzde anaerop bakteriler arasında gittikçe artan antimikrobiyal direnç neden olmaktadır.

Anaerop bakteri izolasyonunda normal şartlarda muayene materyallerinin ortalama %25-50'sinde anaerop bakterilerin izole edilmesi beklenirken, bu oran kan kültürlerinde %10-15, batin içi pelvik apselerde %100, aspirasyon pnömonilerinde %62-93, beyin apselerinde %68-90 civarında olmaktadır (10).

Ülkemizde yapılan çalışmalara baktığımızda; Ercis ve ark. ları (50) yaptıkları çalışmada incelenen 394 klinik örnekten 28 (%7.6) örnekte sadece anaerop ve 75 (%20.5) örnekte ise aerop ve anaerop bakterileri birlikte izole etmişlerdir. Anaerop üremesi olan 103 örnekten 217 anaerop bakteri izole edilmiş, örneklerin 15'inde tek, 88'inde ise aerop ve anaerop karışık olarak birden fazla bakteri üremesi olmuştur.

Bozkurt ve ark. ları (10) yaptıkları çalışmada 238 örnekten 67 (%28.2)'sinde anaerop bakteri izole ederken, bu örneklerden 6'sının apse materyali olduğunu, bu apse örneklerinin sadece 1'inde (%16,6) etken olarak anaerop bakteri izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Doğan ve ark. ları (34) çalışmalarında 100 klinik örneğin 14'ünden (%14) anaerop bakteri izole etmişlerdir. Bu örneklerin 7'sinde aynı anda birden fazla anaerop bakteri saptanırken, 8 örnekte anaerop ve fakültatif anaerop bakterilerin birlikte ürediğini gözlemlemişlerdir. Anaerop bakteri izole

edilen 14 örneğin 8'inin apse (%57), 6'sının ise periton sıvısı (%42) olduğunu bildirmişlerdir.

Kiremitçi ve ark. ları (51) yaptığı çalışmada 243 klinik örnekten 54 anaerop izolat soyutlamışlardır. Klinik örneklerin çoğunu kan (% 39.5) ve apse örnekleri (% 28.8) oluşturmuş, örneklerin 33'ünde (% 13.6) anaerop üreme saptanmış, bunların 14'ünde (% 5.8) sadece anaerop, 19'unda (% 7.8) ise aerop ve anaeroplara birlikte üretilmiştir. Anaeroplardan en çok *Bacteroides* sp. (% 28), *Porphyromonas* sp. (% 19) ve *Peptostreptococcus* sp. (% 11) izole edilmiştir. *Bacteroides* sp. izolatlarının % 80'inde nitrosefin testiyle beta-laktamaz üretimi saptanmıştır.

Bu çalışmada ise anaerop enfeksiyon şüphesiyle gelen 296 klinik örnekten 26 anaerop bakteri (%8.7) izole edildi. İzole edilen 26 anaerop bakterinin 11'ine (%42.3) fakültatif anaerop bakterilerin eşlik ettiği gözlemlendi. İzole ettiğimiz anaerop bakterilerin daha çok apse örneklerinden izole edilmesi (%21.6) giriş kısmında belirttiğimiz gibi klinik örneğin niteliğinin ve miktarının anaerop bakterilerin izolasyonu üzerinde etkili olduğunu bize hatırlatmıştır. 16 apse örneğinin 2'sinde ise (%12.5) etken olarak birden fazla anaerop bakteri izole edildi. Özellikle bakteri izolasyonumuzun yüksek oranda apse materyallerinden yapıldığını göz önüne alırsak, bu oranın ülkemizde yapılmış diğer çalışmalarla uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Kliniklerle yapılan görüşmelerde anaerobik örnek alım şekli ve örneğin bir an önce laboratuvara ulaştırılması ile ilgili hassasiyet anlatılmasına rağmen bu konuda aynı duyarlılığın gösterilmediği düşünülmektedir. Bu yüzden örnek alımı ve ekiminde gecikmeler yaşanmış ve bu durumun izolat sayısının istenilen düzeye ulaşamamasında bir etken olduğu değerlendirilmiştir. Örneklerin transportunda ticari olarak temin edilebilen anaerop transport sistemlerinin kullanılmaya başlamasının hastanemizde anaerop izolasyon etkinliğimizi arttıracaklarını düşünmekteyiz.

Mikrobiyolojik tanıda, laboratuvarın etkinliği açısından, hiçbir şey, uygun örneklerin seçilmesi ve alınması ve de uygun olarak işleme alınmaları kadar önemli değildir. Bu konulara öncelikli önem verilmedikçe, hasta

tedavisine laboratuvar tarafından pek az katkı sağlanabilir. Dolayısıyla, sürece katılan tıbbi personelin her bir üyesi nitelikli örnek elde edilmesinin kritik önemini bilmek ve önem vermek zorundadır. Anaerop kültür için örneklerin alınmasında birincil sorumluluk taşıyan sağlık personeline doğru ve yeterli bilgi verilmesi için gerekli çalışmalar yapılmalıdır. Bu bilgiler, güvenlik, seçme, alma, laboratuvara aktarım, kabul edilebilirlik ölçüleri ve etiketleme konularını kapsamalıdır. Hastanemizde örneğin alındığı andan itibaren ekim yapılana kadar geçen süre, alım tekniği, laboratuvara ulaştırılma hızı, şekli ve benzeri konularda klinikler daha dikkatli ve özenli davrandığında anaerop bakteri izolasyon oranının daha çok artacağını düşünmekteyiz.

Anaerop bakteri suşlarının stoklanarak uzun süre canlı kalabilmesi liyofilizasyon ile daha iyi yapılmaktadır. Çalışmamızda izolasyonu yapılan ve skim milk'de stoklanan 26 anaerop bakterinin ancak 11'ine agar dilüsyon testi yapılabilmektedir. Diğer 15 anaerop bakteri suşu tekrar canlandırılmamıştır. Stoklanan bakterilerin çalışma esnasında canlandırılmaması bizlere anaerop bakterilerin oksijene olan hassasiyetinden kaynaklanan çalışma zorluklarını tekrar hatırlatmıştır.

Çalışmamızda izole edilen 11 bakterinin 10 tanesinde β -laktamaz varlığına rastlanmıştır. Yine bu β -laktamaz pozitif 10 anaerop bakteri penisiline dirençli bulunmuştur. İdentifiye ettiğimiz iki *B. fragilis* izolatından birinde ve *P. intermedia*'da yüksek MİK değerinde penisiline karşı direnç bulunmuştur.

Goldstein ve ark. ları (40) yaptıkları çalışmada izole ettikleri tüm *Bacteroides* türlerinin β -laktamaz ürettiğini ve penisiline karşı dirençli olduğunu göstermiştir.

M. Lorenzo ve ark. ları (52) ise 36 gram-negatif anaerop basil ile yaptıkları çalışmada, izole ettikleri 10 *B. fragilis* türünün tümünü penisiline ve birinci kuşak sefalosporinlere dirençli olarak bulmuşlardır.

Metronidazol direnci dünya genelinde özellikle *Bacteroides fragilis* grubu bakterilerde sıklıkla bildirilmektedir. Ayrıca metronidazol direnci

zorunlu anaerop olmayan sporsuz gram-pozitif anaerop bakterilerde ve *Actinomyces* türlerinde de yaygın olarak bildirilmeye başlanmıştır (36, 45).

Hastanemizde 2000 yılında agar dilüsyon yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada (53) izole edilen *Bacteroides* türlerinde metronidazol duyarlılığı %100 olarak bulunurken, bu çalışmada izole edilen *B. fragilis* izolatlarından bir tanesinde ve *P. acnes* izolatında metronidazol direnci saptanmış, bir *Bifidobacterium* türünde metronidazol orta düzey dirençli bulunmuştur.

Çalışmamızda agar dilüsyonu yapılan tüm anaerop bakteriler kloramfenikole karşı duyarlı bulunmuştur. Kloramfenikol direnci tüm anaerop bakteriler arasında oldukça nadir görülmektedir. İn-vitro özelliği mükemmel olmasına rağmen USA'da hematopoetik etkisinden dolayı kullanımı oldukça sınırlıdır (36).

Klindamisin direnci, son on yılda yapılan süveyans çalışmalarında *B. fragilis* gurubu bakteriler arasında %10-%40 oranında bildirilmektedir (31, 33). Dünya genelinde artan ve coğrafik olarak değişkenlik gösteren klindamisin direncinden dolayı *B. fragilis* gurubu bakterilerin neden olduğu intra-abdominal enfeksiyonlarda klindamisin kullanımı ampirik tedavide önerilmemektedir (45).

Letournel-Glomaud ve ark. ları (19) yaptıkları çalışmada izole ettikleri gram negatif anaerop bakterilerin %21'inde (19/89), gram pozitif anaerop bakterilerin %17'sinde (18/105) klindamisin direncine rastlamışlardır. Doğan ve ark. ları (34) yaptıkları çalışmada izole ettikleri gram pozitif kokların tümünü (n=7), 12 anaerop gram-negatif basilin 4'ünü (%33), 3 anaerop gram-pozitif basilden birini klindamisine dirençli olarak bulmuşlardır.

Löivukene ve ark. ları (33) 1999-2001 yılında izole ettikleri anaeroplara ile yaptıkları çalışmada klindamisin az kullanımına rağmen, şaşırtıcı olarak klindamisine karşı yüksek oranda direnç geliştiğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda izole edilen anaerop bakterilerden 7'si klindamisine karşı duyarlı iken, *B. fragilis* (n=2) ve *P. intermedia* klindamisin dirençli, *Bifidobacterium* sp. türlerinden biri de klindamisine orta düzey duyarlı bulunmuştur.

Ayrıca izole ettiğimiz 11 anaerop bakterinin 2'si (*B. fragilis* ve *P. intermedia*) sefoksitine dirençli, 4 *Bifidobacterium sp.* türünden biri orta düzeyde duyarlı bulurken, geri kalan 8 anaerop bakteri sefoksitine karşı duyarlı bulunmuştur.

Anaerop bakterilerin rutin identifikasyonu ve antimikrobiyal duyarlılıklarını belirlemek zaman alıcı ve zahmetli olduğu kadar, bu alanda çalışacak deneyimli eleman ve donanımlı bir alt yapı gerektirmektedir. Çalışmamızda istenilen rakamlara ulaşamamamıza rağmen, agar dilüsyon yöntemi ile bulduğumuz MİK değerleri, yurtiçi ve yurtdışında anaeroplara yapılan duyarlılık testleri ile uyum göstermektedir.

Klinisyenlerle iletişim halinde olmak anaerop bakteriyoloji için büyük önem taşımaktadır. Anaerop bakteri identifikasyonu zaman alan bir süreç olduğundan, izole edilen anaerop bakterinin en azından gram boyamasının kısa bir raporla kliniğe bildirilmesi hasta açısından kritik bir öneme sahip olacaktır. Anaerop bakteriler için CLSI'nın referans yöntem olarak kabul ettiği agar dilüsyon testini rutin olarak yapmak pek pratik olamamaktadır. Bunun yerine laboratuvarlar izole edilen anaerop bakterileri uygun koşullarda saklamalı, belirli aralıklarla bu suşlara antimikrobiyal duyarlılık testleri yaparak ampirik tedavilere destek olmak için direnç gelişimini takip etmelidirler. Eğer antimikrobiyal duyarlılık testi hasta için kritik bir önem taşıyorsa, agar dilüsyon yöntemi dışında E-test veya identifikasyonla birlikte antimikrobiyal direnci belirleyen çeşitli ticari sistemler kullanılabilir. Ancak laboratuvarların kendileri için en uygun yöntemi belirlemesinde fayda vardır. Ülkemizde anaerop bakterilerle yapılan çalışmalar, gelişen yeni tekniklerin de etkisiyle hız kazanmaktadır. Bu durum bizim için umut verici olmakla birlikte, yapılan bu çalışmaların hastanelerde uygun antibiyotik seçimini ve tedavi stratejilerini yönlendireceği açıktır.

KAYNAKLAR

1. Gürler, N. Anaerob infeksiyonlara genel bakış ve antimikrobiyallere direnç durumu. Aknem Derg. (2001) 15 (No.3): 593-599
2. Gürler, N. Pasteur, anaerobik yaşam ve fermentasyon, Ankem Derg. 2011; 25 (Ek 2): 1-4
3. Gubina, M., Urbančič-Rovan, V., and Tomič V. Anaerobes isolated from clinical material over three years. Anaerobe (1997) 3, 79-81
4. Gürler, N., Anaerop infeksiyonlar ve laboratuvar tanısı. Anaerop bakteri infeksiyonları (eds) Ulusoy S., Leblebicioğlu H. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 9-34, 2005.
5. Rosenblatt, J., E. Can we afford to do anaerobic cultures and identification? A positive point of view. Clinical Infectious Diseases 1997; 25 (Suppl): S127-31
6. Kuru, O., Ozyurt, M. Determination of antimicrobial susceptibilities of clinically isolated anaerobic bacteria by E-test, ATB-ANA and agar dilution. Anaerobe 14 (2008) 161-165
7. Torun, M., M. Anaerop bakteri infeksiyonları: Kültürde sorunlar. Klinik 2003, XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji AB Dalı, İstanbul.), s: 25-28
8. Aydın M., Anaerop bakteriler ve anaerobizm, Ed. Mısırlıgil, Cengiz, Aydın. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji. Konu 11/62. Sa: 569-576/91-110 Güneş Yayınevi, Ankara, 2004
9. Finegold, S. M., Changes in Taxonomy, anaerobes associated with humans, 2001-2004. Anaerobe, 10, 309-312, 2004
10. Bozkurt, H., Guducuoglu, H., Bayram, Y., et.al. Klinik örneklerden izole edilen anaerob bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. Van Tıp Dergisi: 11 (3): 85-91, 2004

- 11.** Doğanay, D., Ü. Anaerop bakterilerin identifikasyonunda çoklu polimeraz zincir reaksiyonu ile yarı otomatize biyokimyasal sistem performanslarının değeriendirilmesi. Uzmanlık tezi, Ankara, 2010
- 12.** Namıkoğlu, L., Anaerobik enfeksiyonların patogenezi ve tedavisindeki yeni gelişmeler. Mikrobiyol Bül., 24: 386-395,1990
- 13.** Citron D., M., Rapid identification of anaerobes in the clinical laboratory. anaerobe (1999) 5, 109-113, Article no.anae.1999.0286
- 14.** Summanen, P., Baron, E., J., Citron, D., M., Strong, C., A., Wexler, H., M., Finegold, S., M. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. Fifth Edition, 1991
- 15.** Winn, W., Jr., Allen, S., Janda, W., et.all. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, sixth edition, chapter 16, p: 890-891
- 16.** Ozinel, M., A. Diyabetik ayak enfeksiyonları: Etkenler ve klinik mikrobiyolojik tanı. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AB Dalı, İzmir, Klimik Dergisi, 2003, s.148-149.
- 17.** Montero, E., V., T.,M.,M., Identification of anaerobes in hospitals of chile. Anaerobe (1999) 5, 105-108
- 18.** Durmaz, B., Anaerop bakterilerin identifikasyonunda sorunlar. 2003 XI Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Cilt:16, Özel sayı: 1, Mart 2003
- 19.** Letournel-Glomaud, C., Haussaye, S., Milhaiha L., Ghnassia, J.,C. E-test antibiotics susceptibility of strict anaerobic bacteria. Anaerobe 9 (2003) 281-284
- 20.** Ardiç, N. *Clostridium difficile* enfeksiyonunun laboratuvar tanısında sorunlar. Klimik Dergisi (2004), Cilt 17, Sayı:3, s:142-145
- 21.** I. Isenberg H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2th Edition, Anaerobic Bacteriology, Section 4, Mangels, J., Culture media for anaerobes
- 22.** Citron, D., M., Hecht D., W. Klinik Mikrobiyoloji, 9. Baskı (Baş Editör Murray, P., R.). Duyarlılık Test Yöntemleri: Anaerobik Bakteriler, Bölüm: 76,

S.1214-1222

- 23.** Song, Y., Liu, C., and Finegold, S., M. Development of a flow chart for identification of gram-positive anaerobic cocci in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, Feb. 2007, Vol. 45, No. 2, p. 512-516
- 24.** Shah, H., N. Olsen, I., Bernard, K., Finegold, S., M., Gharbia, S., Gupta, R., S. Approaches to the study of the systematics of anaerobic, gram-negative, non-sporeforming rods: Current status and perspectives. *Anaerobe* 15 (2009) 179-194
- 25.** Türkan, A., A. Dr. Klinik örneklerden soyutlanan anaerop bakterilerin tanımlanması ve E-test yöntemi ile Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. Tıpta uzmanlık tezi Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Eskişehir, 2008
- 26.** Summanen, P.,H., McTeague, M., Väisänen, M.-L., Strong, C.,A., and Finegold, S., M. Comparison of recovery of anaerobic bacteria using the anoxomat, anaerobic chamber, and gaspak jar systems. *Anaerobe* (1999) 5, 5-9
- 27.** Song Y., PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe* 11 (2005) 79-91
- 28.** Veloo, A., C., M., Welling, G.,W., Degener J.,E., The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS, *Anaerobe* 17 (2011) 211-212
- 29.** Arellano, M., Jomard, P., Kaddouri, El S., Roques C., Nepveu F., Couderc, F. Routine analysis of short-chain fatty acids for anaerobic bacteria identification using capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 741 (2000) 89-100
- 30.** YT, Lin, Identification of clinically important anaerobic bacteria by an oligonucleotide array. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 34 (1): 58-62
- 31.** Hecht, D., W., Anaerobes: Antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe* 12 (2006) 115-121
- 32.** Mutlu, E., Yücesoy, M. Anerop bakterilerde β -laktamaz aktivitesinin ve

antibiyotik Duyarlılığının agar dilüsyon ve E test yöntemleri ile belirlenmesi. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2003; 17(3): 275-280

33. Lõivukene, K., Naaber, P. Antibiotic susceptibility of clinically relevant anaerobes in Estonia from 1999 to 2001. *Anaerobe* (2003) 57-61

34. Doğan, M., Baysal, B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen anaerob bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2010; 44: 211-219

35. Schapiro, J., M., Gupta R., Stefansson, E., Fang F., C., and Limaye A., P. Isolation of metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis* carrying the *nimA* nitroreductase gene from a patient in Washington State. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 2004, p. 4127-4129

36. Goldstein, E., J., C., Citron, M., D., and D., M. M(ASCP), R.M. Alden Research Laboratory, Culver City, California, and David Geffen School of Medicine at University of California, Los Angeles, California. Resistance trends in antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter*. January I, 2011, Vol. 33, No. 1, p. 1-8

37. Bianchini H., M. Methods for susceptibility testing in anaerobes: When and how they should be used. *Anaerobe* (1999) 5, 417-420

38. Goldstein, E., J., C., Citron, D., M., Goldman, P., J., Goldman R., J. National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III, *Anaerobe* 14 (2008) 68-72

39. Hall, G., S., Ph.D., Parshall, S., B.S., MT (ASCP), Cleveland clinic foundation, section of clinical microbiology cleveland, OH. Use of the concentration gradient diffusion assay (E test) for susceptibility testing of anaerobes, fungi, and *Mycobacterium* sp. *Microbiology Newsletter*. July 15, 2002, Vol. 24, No: 14, p. 105-109

40. Goldstein, E., J., C., Citron, D., M., Vaidya, S., A., et.al. In vitro activity of 11 antibiotics against 74 anaerobes isolated from pediatric intra-abdominal infections. *Anaerobe* 12 (2006), 63-66

41. Citron, D., M., Goldstein E., J.,C. Reproducibility of broth microdilution

and comparison to agar dilution for testing CB-183,315 against clinical isolates of *Clostridium difficile*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 70 (2011) 554-556

42. Hall, G., Heimdahl, Nord, A. and C. E.. Comparison of E test and agar dilution methods for determining antibiotic susceptibilities of anaerobic bacteria and viridans streptococci isolated from blood. Anaerobe (1998) 4, 29-33

43. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement, M100-S21, Vol.31 No.1, January/2011, s. 112-113

44. Nakano, V., Silva, A., N., Merino, V., R., C., Wexler H., M., Avila-Campos, M., J. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal *Bacteroidales* strains. Clinics 2011; 66 (4) : 543-547

45. Goldstein, E.,J.,C., Citron, M.,D., and D., M. M(ASCP), R.M. Alden Research Laboratory, Culver City, California, and David Geffen School of Medicine at University of California, Los Angeles, California. Resistance trends in antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria, Part II. Clinical Microbiology Newsletter. January 15, 2011, Vol. 33, No. 2, s. 9-15

46. Conti, R., Zelante, F., Pignatari A.,C.,C., and Mayer M., P.,A. Phenotypic identification and antimicrobial susceptibility of black-pigmented bacteria. Anaerobe (1999) 5, 455-459

47. Clinical and Laboratory Standards Institute, Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları; M100-S18 Cilt: 28, Sayı: 1, Ocak 2008, s. 154-158

48. Clinical and Laboratory Standards Institute, Aerop üreyen bakteriler için dilüsyon yöntemi ile antimikrobik duyarlılık testleri; onaylanmış standart-yedinci baskı, M7-A7, Cilt 26, Sayı 2, Ocak 2006, s. 4-5

49. Gürler N. Anaerop bakterilerin duyarlılık deneyleri. ANKEM Der. 10 (1996) (No.2): 229-236

- 50.** Ercis, S., Tunckanat. F., Hascelik G. Anaerobik enfeksiyon şüpheli hastalardan izole edilen anaerop bakteriler. Mikrobiyol. Bült. 2005; 39: 447-454
- 51.** Kiremitçi, A., Türkkan, A., A., Akgün Y., Durmaz G., Kaşıfoğlu, N. Klinik örneklerden anaerop bakterilerin soyutlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. Ankem derg. 2008;22(3):132-144
- 52.** Lorenzo, M., Garcia, N., Ayala, J., A., Vadillo, S., Piriz, S. Quesada, A. Antimicrobial resistance determinants among anaerobic bacteria isolated from footrot. VETMIC-5549; (2011) p. 1-7
- 53.** Kuru, O. Çeşitli identifikasyon ve duyarlılık test yöntemlerinin anaerobik bakterilerde uygulanabilirlikleri, uzmanlık tezi, 2000