

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK *BACTEROIDES FRAGILIS* GRUBU İZOLATLARDA
ENTEROTOKSİN VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN
PREVALANSI VE MOLEKÜLER TİPLENDİRME**

Dr. Mervenur DEMİR

UZMANLIK TEZİ
Olarak hazırlanmıştır

ANKARA

2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK *BACTEROIDES FRAGILIS* GRUBU İZOLATLARDA
ENTEROTOKSİN VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN
PREVALANSI VE MOLEKÜLER TİPLENDİRME**

Dr. Mervenur DEMİR

UZMANLIK TEZİ
Olarak hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Gülşen HAZIROLAN

ANKARA
2023

TEŞEKKÜR

Tez sürecim ve uzmanlık eğitimim boyunca her konuda desteğini hissettiğim, her zaman çekinmeden danışabildiğim, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışman hocam sayın Doç. Dr. Gülşen Hazırolan'a,

Uzmanlık eğitimim süresince bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sevtap Arıkan Akdağlı ve Prof. Dr. Cumhur Özkuyumcu başta olmak üzere Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli hocalarıma,

Tezime sundukları katkılar için Prof. Dr. Barış Otlu, Prof. Dr. Mehmet Baysallar, Doç. Dr. Ceren Özkul Koçak, Dr. Jozsef Soki ve Uzm. Dr. Elif Seren Tanrıverdi'ye,

Tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Alpaslan Alp ve Prof. Dr. Pınar Zarakolu Köşker'e,

Tez çalışmalarım sırasında teknik destekleri için Nejla Kılıç, Gülden Kaya ve uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığım tüm teknik personelimize,

Hayatım boyunca her konuda beni destekleyen sevgili aileme,

THD-2021-19036 numaralı bu projeye maddi destek veren Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi'ne içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Demir M, Klinik *Bacteroides fragilis* Grubu İzolatlarında Enterotoksin Ve Antibiyotik Direnç Genlerinin Prevalansı Ve Moleküler Tiplendirme, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. Ankara, 2023. *Bacteroides fragilis* grubu (BFG) izolatları ile gelişen enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere dünya çapında artan direnç oranları bildirilmektedir. Direnç profilleri ülkeler, bölgeler ve hatta hastaneler arasında değiştiği için süveyans önem arz etmektedir. Bu çalışmada hastanemizde BFG izolatlarında antibiyotik direnç prevalansının, direncin genetik mekanizmalarının belirlenmesi ve bu izolatların moleküler epidemiyolojisinin saptanması amaçlanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri agar dilüsyon yöntemiyle, direnç genleri tespiti gerçek zamanlı PZR yöntemiyle, moleküler tiplendirme AP-PCR yöntemiyle yapılmıştır. BFG izolatlarının ampicilin, sefoksitin, piperasilin/tazobaktam, imipenem, meropenem, klindamisin, metronidazol ve tigesikline karşı direnç oranları sırasıyla %97.8, %28.3, %11.6, %7.9, %5.1, %47.8, %0 ve %4.3'tür. Tüm izolatlar içinde *cepA*, *cfxA*, *cfiA*, *ermF*, *ermG*, *ermB*, *nim*, *linA*, *mefA*, *msrSA*, *tetQ*, *tetX*, *tetX1* ve *bft* geni sırasıyla %42.8, %44.9, %8.7, %44.2, %10.9, %2.2, %0.7, %29, %17.4, %7.2, %76.1, %8, %37.7 ve %16.7 oranlarında saptanmıştır. Klindamisin direnç genlerinin (*ermF*, *ermG*, *ermB*, *mefA*, *msrSA*, *linA*) BFG izolatlarında yaygın olduğu belirlenmiştir. Karbapenem direnç geni (*cfiA*) taşıyan 12 *B. fragilis* izolatının beşinde upstream bölgesinde IS [*IS1187*(n=3), *ISBf6*(n=1), *IS612B*(n=1)] saptanmıştır. Bu izolatlarda yüksek imipenemaz aktivitesi olduğu gözlenmiştir. Metronidazole azalmış duyarlılık saptanan bir izolatta *nimE* geni saptanmıştır. AP-PCR ile 101 farklı genotip saptanmış, BFG'de yüksek düzeyde genetik farklılık olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada, BFG izolatlarının antibiyotiklere direnç durumları ve direnç gelişiminde önemli role sahip direnç genlerine ait veri sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Bacteroides*, antibiyotik direnci, direnç geni, enterotoksin, ETBF, AP-PCR

Destekleyen kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi, **Proje no:** THD-2021-19036

ABSTRACT

Demir M, Prevalence of Enterotoxin and Antibiotic Resistance Genes and Molecular Typing of Clinical *Bacteroides fragilis* group Isolates, Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Thesis In Medical Microbiology, Ankara, 2023. Increasing rates of resistance to antibiotics used in the treatment of infections caused by *Bacteroides fragilis* group (BFG) isolates are reported worldwide. Surveillance is important as resistance profiles vary among countries, regions, and even hospitals. In this study, it was aimed to determine the prevalence of antibiotic resistance, and genetic mechanisms of resistance in BFG isolates, and to determine the molecular epidemiology of these isolates in our hospital. Antibiotic susceptibility tests were performed using the agar dilution method, resistance genes were determined using the real-time PCR method and molecular typing was performed using the AP-PCR method. The resistance rates of BFG isolates against ampicillin, cefoxitin, piperacillin/tazobactam, imipenem, meropenem, clindamycin, metronidazole, and tigecycline were 97.8%, 28.3%, 11.6%, 7.9%, 5.1%, 47.8%, 0%, and 4.3%, respectively. Among all isolates, *cepA*, *cfxA*, *cfiA*, *ermF*, *ermG*, *ermB*, *nim*, *linA*, *mefA*, *msrSA*, *tetQ*, *tetX*, *tetX1* and *bft* genes were 42.8%, 44.9%, 8.7%, 44.2%, 10.9%, 2.2%, 0.7%, 29%, 17.4%, 7.2%, 76.1%, 8%, 37.7% and 16.7%, respectively. Clindamycin resistance genes (*ermF*, *ermG*, *ermB*, *mefA*, *msrSA*, *linA*) were determined to be common in BFG isolates. ISs [*IS1187*(n=3), *ISBf6*(n=1), *IS612B*(n=1)] were detected in the upstream region of five out of 12 *B. fragilis* isolates carrying the carbapenem resistance gene (*cfiA*). High imipenemase activity was observed in these isolates. The *nimE* gene was detected in one isolate with decreased susceptibility to metronidazole. A total of 101 different genotypes were detected by AP-PCR, indicating high genetic diversity within BFG. In this study, data related to the antibiotic resistance of BFG isolates and the resistance genes that play an important role in the development of resistance are provided.

Keywords: *Bacteroides*, antibiotic resistance, resistance gene, ETBF, AP-PCR

Supporting Organization: Hacettepe University Scientific Research Project Unit,
Project No: THD-2021-19036

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe ve Taksonomi	2
2.2. Patogenez	3
2.2.1. Konağa Ait Faktörler	3
2.2.2. Virülans Faktörleri	3
2.3. Bacteroides fragilis Grubu Bakteriler ile Oluşan Enfeksiyonlar	8
2.4. Bacteroides fragilis Grubu Bakterilerin Laboratuvar Tanısı	9
2.4.1. Numune Toplama ve Taşıma	9
2.4.2. Direkt İnceleme ve Gram Boyama	9
2.4.3. Numunelerin İşlenmesi: Anaerop Kültür Teknikleri	10
2.4.4. Tanımlama	10
2.5. Bacteroides fragilis Grubu Bakteriler ile Meydana Gelen Enfeksiyonların Tedavisi	12
2.6. Bacteroides fragilis Grubu'nda Antibiyotik Direncinin Mekanizmaları	13
2.6.1. Beta-laktam Antibiyotikler	13
2.6.2. Makrolidler ve Linkozamidler	15
2.6.3. Kloramfenikol	15
2.6.4. Tetrasiklinler	16
2.6.5. Kinolonlar	16
2.6.6. Nitroimidazoller	17
2.6.7. IS Elemanları	17
2.8. Bacteroides fragilis Grubu'nda Antibiyotik Duyarlılık Testleri (ADT)	18
2.8.1. Duyarlılık Testlerinin Uygulanmasını Gerektiren Durumlar	18
2.8.2. Duyarlılık Testlerinde Kullanılması Önerilen Antibiyotikler	19
2.8.3. Duyarlılık Test Yöntemleri	20
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	27
3.1. İzolatların Toplanması ve Saklanması	27
3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	28
3.2.1. Stok Solüsyonların Hazırlanması	28
3.2.1. Agar Dilüsyon Plaklarının Hazırlanması	28
3.2.2. Bakteri İnokulumu Hazırlanması ve İnokülasyon	29
3.2.3. Agar Dilüsyon Plaklarının İnkübasyonu	30
3.2.4. Agar Dilüsyon Plaklarının Okunması ve Değerlendirilmesi	30
3.2.5. Beta laktamaz Aktivitesinin Tespit Edilmesi	32
3.2.6. İmipenemaz Aktivitesinin Belirlenmesi	33

3.3. Moleküler Yöntemler	33
3.3.1. DNA Ekstraksiyonu	33
3.3.2. PZR ile Enterotoksin ve Antibiyotik Direnç Genlerinin Saptanması	33
3.3.3. DNA Dizi Analizi	37
3.3.4. Rastgele Başlatılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR)]	37
3.4. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	40
4.1. Tanımlama Sonuçları	40
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	40
4.3. BFG’de Enterotoksin ve Direnç Genlerinin Prevalansı	42
4.4. BFG İzolatlarının AP-PCR ile Genotiplendirilmesi	53
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
7. KAYNAKLAR	69

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Derece santigrad
ADT	Antibiyotik duyarlılık testi
Ana-CIM	Anaerobik karbapenemaz inaktivasyon metodu
AP-PCR	Rastgele başlatılan polimeraz zincir reaksiyonu (Arbitrarily primed polymerase chain reaction)
ATCC	American Type Culture Collection
BFG	<i>Bacteroides fragilis</i> grubu
BFT	<i>Bacteroides fragilis</i> toksin
BHI	Beyin-kalp infüzyon besiyeri
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute)
ÇİD	Çok ilaca dirençli
ETBF	Enterotoksijenik <i>Bacteroides fragilis</i>
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
FAA	Fastidious Anaerobe Agar
FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)
g	Gram
IS	İnsersiyon sekansı (Insertion Sequence)
İBH	İnflamatuvar bağırsak hastalığı
KOB/mL	Koloni oluşturan birim/mililitre
L	Litre
LPS	Lipopolisakkarit
M	Molar
MALDI-TOF MS	Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrophotometry)

mg	Miligram
MİK	Minimal inhibitör konsantrasyon
mL	Mililitre
MLST	Multilokus dizi tiplendirmesi
NCTC	National Collection of Type Cultures
PBP	Penisilin bağlayıcı proteinler
PBS	Fosfat tampon tuz çözeltisi
PFGE	Pulsed-field jel elektroforezi
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RND	Resistance-Nodulation-Division
SMD	Sıvı mikrodilüsyon
U	Ünite
WGS	Tüm genom dizileme
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	<i>B. fragilis</i> 'in Brucella kanlı agardaki görüntüsü ve Gram boyalı mikroskopik görüntüsü.	11
3.1.	Agar dilüsyon cihazı ile bakteri inokulumlarının plaklara inokülasyonu.	30
3.2	Agar dilüsyon yöntemi ile MİK belirlenmesi.	31
3.3.	Gerçek zamanlı PZR'de <i>cfiA</i> geni için elde edilen amplifikasyon eğrileri.	36
3.4.	Erime eğrisi analizi.	36
3.5.	BFG izolatlarının örnek AP-PCR jel görüntüsü.	39
4.1.	Ampisilin MİK değerlerine göre <i>cepA</i> -pozitif ve <i>cepA</i> -negatif BFG izolatlarının dağılımı.	44
4.2.	Sefoksitin MİK değerlerine göre <i>cfxA</i> -pozitif ve <i>cfxA</i> -negatif BFG izolatlarının dağılımı.	44
4.3.	Meropenem MİK değerlerine göre <i>cfiA</i> -pozitif ve <i>cfiA</i> -negatif BFG izolatlarının dağılımı.	45
4.4.	İmipenem MİK değerlerine göre <i>cfiA</i> -pozitif ve <i>cfiA</i> -negatif BFG izolatlarının dağılımı.	45
4.5.	Piperasilin/tazobaktam MİK değerlerine göre <i>cepA</i> , <i>cfxA</i> ve <i>cfiA</i> genlerinin dağılımı.	46
4.6.	Klindamisin MİK değerlerine göre <i>ermF</i> , <i>ermB</i> , <i>ermG</i> , <i>mefA</i> , <i>msrSA</i> ve <i>linA</i> genlerinin dağılımı.	46
4.7.	Metronidazol MİK değerleri ve nim geni dağılımı.	47
4.8.	Tigesiklin MİK değerlerine göre <i>tetQ</i> , <i>tetX</i> ve <i>tetX1</i> genlerinin dağılımı.	47
4.9.	<i>B. fragilis</i> izolatlarında upstream PZR sonrası yapılan jel elektroforezi.	51
4.10.	İmipenemaz aktivitesi: M19, M29, M123 ve M172 numaralı <i>B. fragilis</i> izolatlarında imipenem konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi.	52
4.11.	İmipenemaz aktivitesi: M23, M26, M35, M135 ve M175 numaralı <i>B. fragilis</i> izolatlarında imipenem konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi.	53
4.12.	İmipenemaz aktivitesi: M3, M41, M96, M169, M185 ve M188 numaralı <i>B. fragilis</i> izolatlarında imipenem konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi.	53
4.13.	BFG izolatlarının AP-PCR analizi ile oluşturulan dendrogramı.	54

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Gram negatif anaerop bakterilerde test edilmesi ve raporlanması önerilen antibiyotikler.	19
3.1. Agar dilüsyon testinde çalışılan antibiyotiklerin çözücü, sulandırıcı solüsyonları ve test edilen MİK aralığı ($\mu\text{g/mL}$).	29
3.2. Anaerop bakteriler için antibiyotik sınır değerleri.	32
3.3. Gerçek zamanlı PZR için hazırlanan karışımın içeriği.	34
3.4. Gerçek zamanlı PZR analizi ile direnç genlerinin tespiti için kullanılan oligonükleotid primerleri ve parametreleri.	35
3.5. 2x amplifikasyon karışımının hazırlanması.	37
3.6. 50 μl olan amplifikasyon karışımının hazırlanması.	38
3.7. AP-PCR için kullanılan ısı döngü profili.	38
4.1. BFG izolatların elde edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı.	40
4.2. BFG İzolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları.	41
4.3. BFG izolatlarında antibiyotik direnç genlerinin dağılımı.	43
4.4. Kan ve kan dışı klinik örneklerden izole edilen <i>B. fragilis</i> ve diğer BFG türlerinde antibiyotiklere duyarlı olmama durumu ve direnç genlerinin prevalansı.	48
4.5. <i>B. fragilis</i> 'te <i>bft</i> -pozitif ve <i>bft</i> -negatif izolatlarda antibiyotik direnci ve direnç genlerinin prevalansı.	49
4.6. Karbapenem dirençli veya karbapenem direnç geni (<i>cfiA</i>) pozitif izolatların (n=15) özellikleri.	50
4.7. Karbapenem dirençli veya karbapenem direnç geni (<i>cfiA</i>) pozitif izolatların (n=15) upstream PZR ve imipenemaz aktivitesi sonuçları.	52

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bacteroides fragilis grubu (BFG) olarak adlandırılan; *Bacteroides*, *Parabacteroides* ve *Phocaeicola* cinsine ait >20 türün yer aldığı bu bakteri grubu anaerobik enfeksiyonlarda en sık izole edilen türlerdir (1). İnsanlarda mukozal bölgelerde, özellikle gastrointestinal sistem mukozasında bulunan kommensal mikrobiyatanın önemli üyeleridirler. Bu bakteriler travma, ameliyat veya kanser gibi durumlarda mukozal bariyerin bozulmasını takiben normalde steril olan vücut bölgelerine eriştiklerinde ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler. Uygun antibiyotik tedavisi uygulanmadığında bu enfeksiyonlardan ölüm oranları %60'a kadar çıkabilir (2-4).

BFG enfeksiyonlarının tedavisi, anaerobik antibiyotiklere dünya çapında artan direnç raporları nedeni ile giderek daha zor hale gelmiştir (5). Direnç profilleri ülkeler, bölgeler ve hatta hastaneler arasında değiştiği için tedavide uygun antibiyotik protokolünü belirlemek önem arz etmektedir (6-8). Anaerop duyarlılık testi yapılamayan merkezlerde, tahmin edilen duyarlılık modelleri hasta yönetimine rehberlik edebilir ve tedavi başarısızlıklarını önleyebilir. Bu çalışmada hastanemizde BFG'de antibiyotik direnci prevalansının, direncin genetik mekanizmalarının belirlenmesi ve bu izolatların moleküler epidemiyolojisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Direnç prevalansının ve mekanizmalarının bilinmesi antibiyotik yönetiminin temelini oluşturmaktadır. Bu araştırmanın sonuçları ile hastanemizde izole edilen BFG bakterilerin antibiyotik direnç mekanizmalarının aydınlatılması ve bu bakterilerle meydana gelen enfeksiyonların tedavisi için yol gösterebilecek verilerin ortaya konması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Taksonomi

Bacteroides fragilis ilk olarak 1898 yılında Veillon ve Zuber tarafından *Bacillus fragilis* olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Castellani ve Chalmers tarafından 1919 yılında *Bacteroides* cinsi ve Bacteroidaceae ailesi adlandırılmış, bu sınıflandırma 1980 yılında onaylanmıştır (9).

BFG üyeleri Bacteroidota filumu, Bacteroidia sınıfı, Bacteroidales takımında bulunmaktadır. Daha önce *Bacteroides* cinsine bağlı olan birçok tür, *Porphyromonas* cinsine veya *Prevotella* cinsine aktarılmıştır. Bacteroidaceae ailesinde *Bacteroides* ve *Phocaeicola* cinsi bakteriler yer alırken, *Parabacteroides* cinsi Tannerellaceae ailesinde yer alır. Bu cinsler birbiriyle ilişkili olup tümü Bacteroidales takımına aittir.

Tarihsel olarak, BFG’de taksonomik sınıflandırmalar 16S rRNA gen dizilimine göre belirlenmiştir. Daha yakın zamanlarda, tüm genom dizileme (WGS) teknolojisindeki gelişmeler ve ortalama nükleotid kimliği (average nucleotide identity, ANI) ve genom BLAST mesafe filogenisi (genome BLAST distance phylogeny, GBDP) gibi daha kapsamlı tür sınırlandırma yöntemlerinin geliştirilmesi Bacteroidota filumu içinde taksonomik revizyonlar yapılmasına neden olmuştur. Geçmişte *Bacteroides* cinsi içinde yer alan *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides merdae* ve *Bacteroides goldsteinii* "Tannerellaceae" familyasında *Parabacteroides* cinsi içinde yeniden sınıflandırılmıştır (10). Yakın zamanda, 1.000’den fazla *Bacteroides* genomunun incelendiği GBDP yöntemini kullanan bir çalışma sonrası *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides dorei* ve *Bacteroides massiliensis* türleri *Phocaeicola* cinsi içinde sınıflandırılmıştır (11). Ayrıca WGS çalışmaları *B. fragilis* bölüm I (division I) ve bölüm II (division II) olmak üzere genetik olarak farklı iki alt gruba ayrıldığını göstermiştir. *B. fragilis* bölüm I ve bölüm II izolatları genetik farklılığın yanında antibiyotik direnci ve patojenite açısından da farklılıklar göstermektedir (6). Günümüzde BFG bakteriler; *Bacteroides* türlerini (*B. acidifaciens*, *B. caccae*, *B. cellulosilyticus*, *B. eggerthii*, *B. faecis*, *B. fragilis*, *B. helcogenes*, *B. intestinalis*, *B. nordii*, *B. ovatus*, *B. pyogenes*, *B. salyersiae*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. xylanisolvens*) ve *Phocaeicola* türlerini (*P. coprocola*, *P. dorei*, *P. massiliensis*, *P. plebeius*, *P. vulgatus*) kapsamaktadır. Aile düzeyinde farklılık

olmasına rağmen *Parabacteroides* türleri (*P. distasonis*, *P. goldsteinii*, *P. gordonii*, *P. johnsonii*, *P. merdae*) klinik araştırmalarda yaygın olarak BFG'ye dahil edilmektedir (12).

BFG içindeki filogenetik çeşitlilik fazla olduğundan ve antibiyotik direnci türler arasında farklılık gösterdiğinden taksonomi ve tür düzeyinde tanımlamalar büyük klinik değere sahiptir (6, 11). Geçmişte tanımlama yöntemlerinin kısıtlılığı nedeniyle BFG içindeki bakteriler nadiren tür düzeyinde tanımlanmış ve raporlanmıştır. Ancak moleküler tanı yöntemlerindeki gelişmelerle ve matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) teknolojisinin kullanıma girmesiyle laboratuvarların tür düzeyinde tanımlama oranları büyük ölçüde artmıştır (6).

2.2. Patogenez

2.2.1. Konağa Ait Faktörler

Genel olarak enfeksiyona zemin hazırlayan faktörler anaeroblarla gelişen enfeksiyonlara da zemin hazırlayabilir. Diabetes mellitus, nötropeni, hipogamaglobulinemi, malignite, karaciğer hastalığı, splenektomi, kollajen vasküler hastalık, sitotoksik ilaç tedavisi, kortikosteroid tedavisi ve immünsüpresyona neden olan diğer durumlar bu kategoriye dahildir. Bununla birlikte diyabetiklerde anaerobik kolesistit ve anaerobik osteomyelit; nötropenik kolit; akciğer, kolon ve uterus karsinomunda lokal anaerobik enfeksiyonların insidansında artış gibi daha spesifik ilişkiler ve birliktelikler olabilir. Redoks potansiyelinin azalmasına yol açan koşullar, daha özgül olarak anaerobik enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadır. Bu kategoriye obstrüksiyon ve staz, doku anoksisi, doku yıkımı, vasküler yetmezlik, önceki aerobik enfeksiyon, yanıklar, yabancı cisim implantasyonu ve kırıklar dahildir. Anaerobik enfeksiyonlara zemin hazırlayan diğer klinik durumlar arasında lösemi, oral, gastrointestinal ve kadın pelvik cerrahisi, diğer vücut bölgelerinde travma, doğum, aspirasyon pnömonisi, insan ve hayvan ısırıkları ve aminoglikozidler ya da kinolonlar gibi anaeroblara karşı zayıf aktiviteye sahip antibiyotiklerle tedavi uygulanmış olması yer alır (13-15).

2.2.2. Virülans Faktörleri

B. fragilis insanda kolon mikrobiyotasının sadece %0,5'ini oluşturmalarına rağmen, güçlü virülans faktörlerine bağlı olarak en sık izole edilen anaerobik

patojendir. Virölans faktörleri genel olarak üç geniş kategoriye ayrılabilir: i) konak hücrelere adezyon, ii) konak immün yanıtından kaçma (fagositoz ve oksijen toksisitesi gibi) ve iii) doku yıkımı. *B. fragilis*'in fimbriaları ve aglütininleri, adezinler olarak işlev görerek, konak dokuda yerleşmeye olanak sağlar. Polisakkarit kapsül, lipopolisakkarit (LPS) ve çeşitli enzimler, konak bağışıklık yanıtından korunmada rol oynar. Kapsül apse oluşumundan sorumludur ve *B. fragilis*'te bulunan histolitik enzimler doku yıkımına aracılık eder (1).

Pili & Fimbria

B. fragilis'in konak hücre yüzeyiyle etkileşimine farklı yapılar katkıda bulunur. *B. fragilis*, adezyon ve hemagglütinasyonda rol oynayan peritriköz fimbriyalara sahiptir. Pilinin rolü hemagglütinasyon ve bağırsak hücrelerine yapışmada tanımlanmıştır. Hem pili hem de kapsül, hedef hücrelere yapışmada rol oynar, ancak pilinin rolü daha önemlidir (16). *B. fragilis* konak yüzey molekülleri ile etkileşime katkıda bulunan kolajen tip I adezyon (kolajen bağlayıcı glikoprotein (cbp1)), laminin bağlayıcı protein, Ton B'ye bağlı bir dış zar proteini (omp), fibrinojen bağlayıcı protein ve plazminojen bağlayıcı protein (pbp) gibi bazı adezyon molekülleri kodlar (17). Ayrıca reseptör olarak sialik asit ile etkileşime giren lektin benzeri adezyonun varlığı gösterilmiştir (18).

Endotoksin/LPS

B. fragilis toksik etkisi *E. coli* ile kıyaslandığında 10-1000 kat daha zayıf olan farklı bir LPS'ye sahiptir (19). Antibiyotiklere maruziyet ile endotoksin salınımı *B. fragilis*'te diğer BFG üyelerine göre daha belirgindir (20). LPS ve kapsül bakterinin enfeksiyon bölgesinde yerleşmesine izin veren adezinler olarak işlev görür (21).

Kapsüller Polisakkaritler

BFG izolatlarının çoğu kapsüllüdür ve kapsül varlığı vürulansta önemli rol oynar. *B. fragilis*'in kapsüller polisakkaritleri (PS) güçlü bir şekilde apse oluşumunu uyarır (22). PS-A, PS-B ve PS-C olmak üzere üç farklı PS tanımlanmıştır. İn vivo bir çalışmada pürifiye PS-A ve PS-B'nin her ikisinin de hayvan modellerinde apse oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. PS-B ve PS-C sentezleyemeyen mutantlar *B. fragilis* National Collection of Type Cultures (NCTC) 9343 izolatı ile benzer şekilde apse oluşumunu indüklemiştir. Ancak *B. fragilis* NCTC 9343 izolatı PS-A oluşturamadığı zaman apse oluşumu önemli ölçüde azalmıştır. PS-A apse indüksiyonu için gerekli

olan benzersiz bir serbest amino şekere sahiptir (23). PS A ayrıca klonal CD4⁺ T hücre ekspansiyonunu ve IL-10 oluşturan hücreleri aktive eder (24, 25).

Ekstrasellüler Enzimler

B. fragilis izolatları konakta ekstrasellüler matrikse penetrasyonu sağlayan hiyalüronidaz, kondroitin sülfataz, deoksiribonükleaz, proteazlar, fosfatazlar ve lipazlar dahil olmak üzere çeşitli hücre dışı ve histolojik enzimler üretir (26). Hemolizin üretimi konak hücrelere ve eritrositlere hasar vererek *B. fragilis*'in in demir ve hem erişimini kolaylaştırabilir (27). *B. fragilis*'te sinerjistik etkileşime sahip olan iki hemolizin (HlyA ve HlyB) tanımlanmıştır (28). Nöraminidaz H (*nanH*), *B. fragilis*'te mürin polisakkaritlerini parçalayan ve glikoz sağlayarak mikroorganizmaların büyümesini artıran en yaygın enzimdir. Nöraminidaz, siyalik asit motifini hücrelerin yüzeyinden, IgG gibi immünolojik aktif faktörlerden ve kompleman sisteminin bazı araçlarından uzaklaştırarak konak fonksiyonlarını bozan önemli bir virölans faktörüdür (17).

Tip VI Sekresyon Sistemleri (T6SS)

Araştırmalar *B. fragilis*'in bakteriyosinler, proteazlar, glikosidazlar ve hemolizinler, önemli metabolik ve patojenik roller oynayan biyolojik aktif moleküller salgıladığını ortaya koymaktadır (29, 30). *B. fragilis*'in genomunda TolC homologlarının varlığı, gösterilmiştir. TolC, antibiyotikleri dışarı pompalamak için efluks pompaları ve molekülleri dışarı aktarmak için tip I sekresyon sistemi ile iş birliği içinde olan bir dış zar proteinidir. Ancak, TolC homolog kodlayan genlerin aşırı ekspresyonu *B. fragilis*'te rapor edilmemiştir (31). *B. fragilis*'te Proteobacteria'da gösterilen tip VI salgı sisteminden oldukça farklı bir tip VI salgılama sistemi (T6SS) rapor edilmiştir. *B. fragilis*'in T6SS'nin, hayvan modelinde kolonizasyonu sırasında eksprese olduğu ve *B. thetaiotaomicron* kolonizasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir (32). T6SS, lipoproteinlerin hücre yüzeyi organizasyonunu ve/veya sekretomda tespit edilebilen bazı moleküllerin salgılanmasını indükleyebilir. T6SS, hücre duvarını, membranları etkileyen proteinler ve enzimler; DNA yıkım enzimleri gibi çok çeşitli efektörlere sahiptir (32-35). T6SS, insan bağırsağında bulunan farklı Bacteroidales türleri ile etkileşimlere aracılık eder ve *B. fragilis* için rekabet avantajı sağlar (32, 33, 36). Bununla birlikte, *B. fragilis* T6SS'nin patogenezdaki kesin rolünün anlaşılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

***Bacteroides fragilis* Toksin (BFT)**

Frajilizin olarak da bilinen BFT, enterotoksijenik *B. fragilis* (ETBF) izolatları tarafından salgılanır. BFT moleküler ağırlığı 21 kDa olan, çinko bağımlı, ısıya duyarlı bir metalloproteazdır. BFT1, BFT2 ve BFT3 olmak üzere üç izoformu gösterilmiştir. En yaygın olan BFT1'dir. BFT E-kadherini parçalayarak zonula adherensi tahrip eder. Bu da epitel hücrelerinin aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine, hücreler arası bağlantıların yıkımına bağlı olarak geçirgenlikte artışa ve ishale neden olur (1, 37). BFT'nin inflamatuvar bağırsak hastalığı ve kolorektal kanser patogeneğinde rolü olduğu öne sürülmektedir. BFT kolonda inflamasyonda görevli IL-8 salınımını uyarır. Ayrıca apoptoz protein-2 (c-IAP2) ve spermin oksidazın (SMO) hücrel inhibitorünün indüklenmesiyle reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu, DNA hasarını ve hücre proliferasyonunu indükler. β -katenin'in nükleer birikimi, onkogen *c-myc* aşırı ekspresyonunu ve insan kolon epitel hücrelerinin kalıcı proliferasyonuna neden olur. BFT ek olarak NF- κ B aktivasyonu ile pro-kanserojen sinyali indükler (17, 38, 39).

DNA İnversiyonları ve Faz Varyasyonu

B. fragilis, DNA'nın protein kodlayan bölgelerinin yanı sıra promoter bölgesinde DNA inversiyonu aracılığıyla genleri açık-kapalı hale getirebilir ve yüzey yapılarını değiştirebilir (40, 41). Bu durum faz varyasyonu olarak adlandırılır. Yüzey yapılarını değiştirme yeteneği, *B. thetaiotaomicron*'a kıyasla mukozal yüzeylerden sıklıkla olarak izole edilen *B. fragilis*'te daha yaygındır (41). *B. fragilis*'in DNA inversiyonlarının farklı yapıların üretilmesinde rolü olduğu gösterilmiştir. Dış membran proteinlerinin SusC/SusD ailesi (nişasta kullanım sistemi), oto-agregatif fenotip ile ilişkili yüzey proteinleri, dış membran vezikül (OMV) ve yüksek moleküler ağırlıklı ekstrasellüler polisakkarit (EPS) bu yapılara örnek olarak verilebilir (42-45). Faz varyasyonları, konak bağışıklık yanıtını, besin alımını ve biyofilm oluşumunu modüle ederek mikroorganizmaların stabilitesinde önemli olabilir (44). *B. fragilis*'in promoter inversiyonları, DNA'nın farklı bölgelerindeki invertaz genleri tarafından kontrol edilir. *Mpi* bunlar arasında en çok bilinenidir. *B. fragilis*'in yedi polisakkarit promoter bölgesinin tamamının inversiyonunu ve ayrıca tarif edilmemiş ürünlerin ekspresyonunu düzenleyen altı promoterin inversiyonunu kodlar (46).

Aerotolerans

B. fragilis'in diğer *Bacteroides*'lere göre oksijene karşı daha dirençli olduğu gözlemlenmiştir. Hatta *B. fragilis*'in sitokrom bd oksidaz ekspresyonu ile nanomolar seviyelerde oksijen tüketebildiği gösterilmiştir (47). *B. fragilis*'te hem oksijene duyarlı hem de oksijene bağımlı ribonükleotit redüktazların varlığı, oksijen içeren ortamlarda DNA'sının kopyalanabileceğini gösterir. Bununla birlikte, *B. thetaiotaomicron*'da oksijene bağımlı ribonükleotit redüktaz izoenziminin varlığı gözlenmemiştir (48). Ek olarak, *B. fragilis*'in nispeten H_2O_2 'ye dirençli bir fumaraz'a sahip iken, *B. thetaiotaomicron*'un fumaraz'ı daha duyarlıdır. Zorunlu bir anaerob olan *B. fragilis*, atmosferik oksijene (%21) maruz kaldığında çoğalamaz. Bununla birlikte, *B. fragilis* aerotoleran bir bakteridir ve tamamen aerobik koşullarda birkaç gün canlı kalabilir. Bunun nedeni reaktif oksijen türlerinin (ROS) güçlü ve etkili detoksifikasyonudur (49). ROS'a yanıtta farklı metabolik ve detoksifikasyon enzimlerinin ifadeleri indüklenir, nrdAB (aerobik ribonükleotit redüktaz), oksijenle indüklenen nişasta kullanımı, katalaz, süperoksit dismutaz, alkil hidroperoksit redüktaz, tioredoksin peroksidaz, sitokrom C peroksidaz, tiyol bileşikleri, nonspesifik DNA bağlayıcı protein ve ferritin buna örnek olarak verilebilir (17, 50-52). Oksidatif strese karşı hayatta kalma yeteneği, enfeksiyonu başlatma ve sürdürme yeteneğinde rol oynar.

Demir Alımı

Demir ve hem, *Bacteroides* türlerinin üremesi ve hayatta kalması için gereklidir. Hem *Bacteroides* türlerinin üremesini doza bağlı olarak indükler (53, 54). Ancak *Bacteroides* türlerinin demir ile etkileşimi ve hücre içine alımı ile ilgili yeterli veri yoktur. Bakteriler genellikle ferrik demiri sideroforlar yoluyla alırlar. Sideroforlar, farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen küçük, yüksek afiniteli demir şelatlayıcı maddelerdir (55). *Bacteroides* türlerinin siderofor sentezlediği rapor edilmemiştir. Ancak mikrobiyotada siderofor üreten mikroorganizmaların yoğun olarak yaşadığı bir ortamda bir arada bulunurlar. Bu nedenle, *Bacteroides*'in demir almak için ksenosideroforları kullanabileceği varsayılabilir (56). *B. fragilis* demir kısıtlı anaerobik ortamda demir elde etmek için Fe(III)-ferrikromu kullanır. *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482 ve *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI 5482 ise Fe(III)-enterobaktin and Fe(III)-salmochelin S4'ü kullanır (57). Fe (III)-ferrikromdan ayrılan demir, periplazmik aralıktan sitoplazmaya FeoAB sistemi ve CobN benzeri

proteinler BtuS1 ve BtuS2 tarafından taşınır (58). Anaerobik koşullar altında *B. fragilis*'in periplazmasında ferrik demirin indirgenmesi ve Fe(III)-ferrikromdan salınmasına neden olan mekanizma henüz açıklanmamıştır.

Biyofilm

B. fragilis izolatları, kolon mukozasında biyofilm oluşturur (59). Bir çalışma, inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) hastalarının kolon mukozası üzerindeki biyofilm yoğunluğunun, kontrol grubundaki miktarın yaklaşık iki katı olduğunu göstermiştir. İBH bulunan hastalarda biyofilm kütlesinin >%60'ından *B. fragilis*'in sorumlu olduğu bildirilmiştir (60). Biyofilm oluşumu, enfeksiyon sırasında konak savunma mekanizmalarına ve antibiyotiklere karşı direnci arttırmaktadır (61).

2.3. *Bacteroides fragilis* Grubu Bakteriler ile Oluşan Enfeksiyonlar

BFG insan mikrobiyotasında bulunur ve genellikle mukozal bariyerlerin hasarı sonrası normalde steril olan vücut bölgelerine geçerek fırsatçı, endojen enfeksiyonlara yol açar. Mukozal hasarın ana nedenleri neoplazmlar, divertikülit, apandisit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, cerrahi veya travma gibi durumlardır. Mikrobiyotada aerobik ve fakültatif anaerobik bakteriler ile birlikte bulunduklarından anaerobik enfeksiyonlar genellikle polimikrobiyaldir, ancak tek etken olarak da bulunabilirler. BFG anaerobik enfeksiyonlarda en sık izole edilen gruptur ve bu grup içinde de *B. fragilis* türü ilk sıradadır. Bu enfeksiyonlar hafif, kendini sınırlayan diyareden, hayatı tehdit eden kan dolaşımı enfeksiyonlarına kadar geniş bir spektrumdadır (62). İntraabdominal apse, apandisit, peritonit gibi batın içi enfeksiyonlar BFG'nin neden olduğu enfeksiyonlar içinde ilk sırada yer almaktadır. Bartolin apsesi, tuboovaryan apse, pelvik inflamatuvar hastalık (PID), endometrit, septik tromboflebit, pyometra, septik abort, yara enfeksiyonları gibi jinekolojik enfeksiyonlara neden olabilirler (63). İntraabdominal enfeksiyonlarda olduğu gibi pelvik enfeksiyonlar da genellikle aerobik bakterilerin de dahil olduğu polimikrobiyal enfeksiyonlar şeklindedir. Ancak pelvik enfeksiyonlarda saf olarak anaerobik bakteri izole edilmesi durumu intraabdominal enfeksiyonlara göre daha yüksektir (62). Cerrahi yara yeri enfeksiyonlarında; nekrotizan fasiit diyabetik ayak, dekübit ülser, kutanöz apse ve yara enfeksiyonları gibi cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında BFG bakteriler en sık anaerobik etkenler arasında yer alır. BFG ilişkili bakteriyemide mortalite %19'dan fazladır. Tedavi edilmediği takdirde ise ölüm oranının yaklaşık %60 olduğu bildirilmektedir. Bununla

birlikte, bu ölüm oranı, uygun antibiyotik tedavisinin kullanılmasıyla büyük ölçüde iyileştirilebilir (4, 64). Bu nedenle, terapötik rejimler genellikle bu türleri kapsayacak şekilde tasarlanır. BFG ile endokardit gelişmesi nadir de olsa görülebilir. Ancak gerçekleştiği durumda mortalite oranının %21-43 arasında olduğu bildirilmiştir (1). Daha nadir olmakla birlikte BFG intrakranial apse, osteomyelit, septik artritis, pnömoni ve akciğer apsesi gibi enfeksiyonlara neden olabilir. ETBF özellikle 1-5 yaş arası çocuklarda sulu diyareye yol açabilir. Erişkin hastalarda tanı konulmayan ishallerde de ETBF'nin rolü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ETBF izolatlarının İBH ve kolorektal karsinoma ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (1, 62, 63).

2.4. *Bacteroides fragilis* Grubu Bakterilerin Laboratuvar Tanısı

2.4.1. Numune Toplama ve Taşıma

Numuneler, mukozal yüzeylerin lokal mikrobiyotası ile kontaminasyonu en aza indirecek şekilde toplanmalı ve mümkünse antibiyotik tedavisine başlamadan önce ya da bir sonraki ilaç dozu verilmeden hemen önce alınması gerektiği de unutulmamalıdır. Optimal numuneler genellikle kan, plevral ve peritoneal sıvılar gibi steril sıvılar, derin aspirasyon ve biyopsi örnekleridir. Alınan numune, hemen bir anaerobik taşıma ortamına aktarılmalı veya alternatif olarak hava miktarını ortadan kaldıracak veya en aza indirecek şekilde steril bir tüpte, oda ısısında taşınmalıdır. Kan örnekleri anaerobik kan kültürü şişesine alınmalıdır. Numuneler mikrobiyolojik incelemeler için hızlı bir şekilde laboratuvara ulaştırılmalıdır (anaerob taşıma ortamında <2 saat, steril tüpte <1 saat) (63, 65).

2.4.2. Direkt İnceleme ve Gram Boyama

Numunelerin doğrudan makroskopik incelemesi, kötü koku, nekrotik doku, pürülan akıntı, gaz varlığı anaerobik enfeksiyon şüphesine neden olabilir. Bununla birlikte, bu özelliklerin olmaması anaerobik enfeksiyonu dışlamaz. Numunenin Gram boyama ile mikroskopik incelemesi, mikroorganizmaların sayısını ve morfolojisini, inflamatuvar hücrelerin varlığını veya kontaminasyona işaret eden yassı epitel hücrelerinin varlığını göstermesi bakımından kıymetlidir. Anaerobik enfeksiyonlar genellikle polimikrobiyal olduğundan, Gram boyamada inflamatuvar hücrelerle birlikte çok ve farklı sayıda mikroorganizma görülmesi anaerobik enfeksiyon göstergesi olabilir (63, 65).

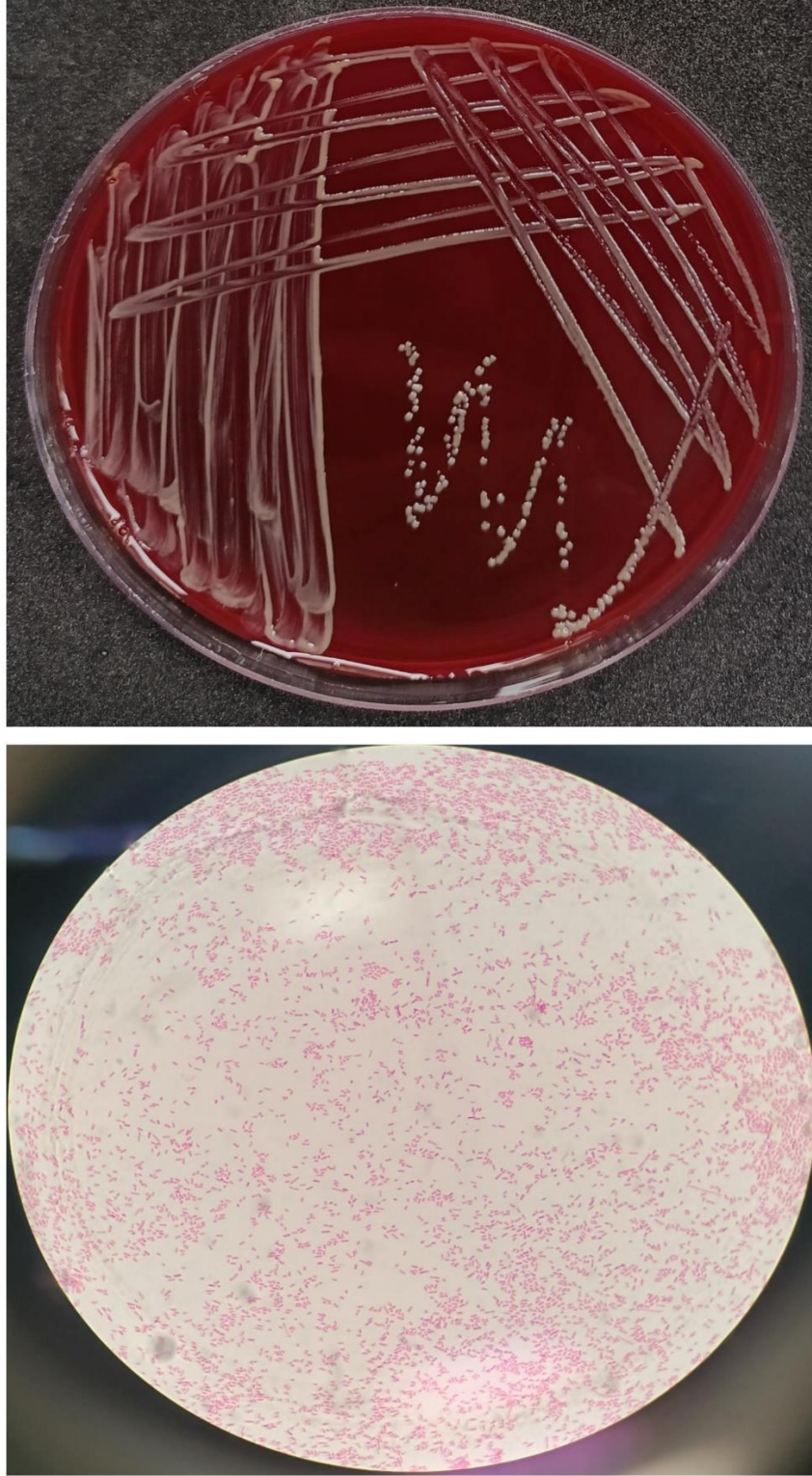
2.4.3. Numunelerin İşlenmesi: Anaerob Kültür Teknikleri

Numunelerin kültürü için seçici ve seçici olmayan besiyerleri kullanılmalıdır. Seçici olmayan besiyeri olarak anaerobik Brucella kanlı agar (at veya koyun kanı, hemin ve K1 vitamini ilaveli)/CDC Anaerobik Kanlı Agar/Schaedler agar/Fastidious Anaerobe Agar (FAA); seçici besiyeri olarak *Bacteroides* safra-eskülin agar (BSEA)/kanamisin vankomisin hemolizli kanlı agar/paromomisin vankomisin kanlı agar/anaerobik fenietil alkol kanlı agar (FEA) kullanılabilir. Numuneler ayrıca zenginleştirilmiş tiyoglikolat buyyona ekilmelidir. İnokülasyondan sonra plaklar en kısa sürede 35-37°C’de anaerobik atmosfere kaldırılmalıdır. Anaerobik ortam için anaerobik kabin, kavanozlar (GasPak ile/gaz doldurulabilir kavanozlar) veya plastik torbalar gibi yöntemler kullanılmaktadır. Plakların ekiminden sonra ilk değerlendirme 48. saatte yapılmalıdır. Üreme olmaması durumunda plaklar tekrar inkübasyona kaldırılmalıdır. Vakaların çoğunda inkübasyon süresi 5-7 gün olmalıdır (63). BFG, ticari kan kültürü sistemlerinin anaerobik şişesinde etkin bir şekilde saptanır . BFG için kan kültürü pozitifliğine kadar geçen süre nispeten kısadır; örneğin, bir rapor, kan kültürü pozitifliği için ortalama sürenin 32 saat olduğunu ve kültürlerin %99’unda BFG sinyalinin 60 saat içinde pozitif olduğunu belirtmektedir (66).

2.4.4. Tanımlama

Kültürlerde üreyen kolonilerin ilk incelemesi bir stereomikroskop veya en azından büyüteç kullanılarak yapılmalıdır. Uzaktan bakıldığında benzer görünen koloni morfolojileri, büyütüldüğünde ayırt edilebilir ve daha büyük kolonilerin yakınındaki küçük kolonilerin varlığı fark edilebilir. BFG bakteriler anaerobik kanlı agarda 1-4 mm çapında, düzgün kenarlı, gri renkli, hemolizsiz, yarı opak koloniler oluşturur. Eskülini hidroliz etmeleri ve %20 safraya dirençli olmaları nedeniyle BBEA’da büyük, düzgün kenarlı, etrafı ve kendisi siyah koloniler oluşturur. *P. vulgaris* her zaman siyah koloni oluşturmayabilir (67). Tüm farklı kolonilerden Gram boyama yapılmalı, ayrıca aerotolerans testi için bir anaerobik kanlı agara ve bir çikolata agara pasajlanmalıdır. BFG bakteriler; 0.5-0.8 µm çapında, 1.5-9 µm uzunluğunda, yuvarlak uçlu, gram negatif basillerdir. Sıvı besiyeri kültüründeki hücreler pleomorfizm gösterme eğilimindedir ve vakuollü formlar gözlenebilir. Ön tanımlama için antibiyotik disklerinden faydalanılabilir. BFG vankomisin (5 µg),

kolistin (10 µg), penisilin (2 U) ve kanamisin (1000 µg) disklerine dirençli, rifampin (15 µg) diskine duyarlıdır.



Şekil 2.1. *B. fragilis*'in Brucella kanlı agardaki görüntüsü (üstte) ve Gram boyalı mikroskopik görüntüsü (altta).

Yakın zamana kadar cins ve/veya tür tanımlamasında biyokimyasal yöntemler kullanılmıştır. Ancak, bu yöntemler zaman alıcıdır (1-5 günlük anaerobik inkübasyon), külfetlidir ve okumalar sırasında subjektif değerlendirme yapılmaktadır. Günümüzde, sınırlı olanaklara sahip laboratuvarların klinik açıdan önemli anaerobik bakterileri tanımlamasına izin verecek biyokimyasal testlere dayalı, basit ve hızlı (4-6 saat) tanımlama sistemleri bulunmaktadır (örn. API ANA BioMérieux, ANI Card, BioMérieux, MINITEK Becton-Dickinson). Laboratuvarlar ayrıca manuel olarak kendi tanımlama kitlerini de oluşturabilirler, fakat bu yöntemlerle tür düzeyinde tanımlama imkanı kısıtlıdır.

Anaeroplara metabolizmaları sırasında oluşan ürünlerin veya yağ asidi kompozisyonunun tespitine dayalı gaz-likit kromatografisi (GLC) anaerobik bakterilerin tanımlamasında kullanılmıştır (65, 68, 69). Kütle spektrometrisinin (MALDI-TOF MS) laboratuvarların rutinine girmesi ise tanımda büyük bir devrim olmuştur. Bu teknik, klinik izolatların hızlı bir şekilde tanımlanması için kullanışlı ve basit bir yöntemdir. MALDI-TOF MS ile tür tanımlamasının ötesinde; suş tiplendirmesi ve antibiyotik duyarlılık testi yapmak da mümkündür (70-72). Klinik numunelerden anaerob bakterilerin saptanmasında veya diğer yöntemlerle tanımlanamayan izolatların tanımlanmasında veya diğer yöntemler ile yapılan tanımlamanın doğrulanmasında 16S rRNA gen dizilemesi kullanılabilir (63, 65). BFG üyeleri arasında antibiyotik direnç paterni açısından farklılıklar bulunduğu için tür düzeyinde ayırım yapılması önemlidir (12).

2.5. *Bacteroides fragilis* Grubu Bakteriler ile Meydana Gelen Enfeksiyonların Tedavisi

Anaerobik enfeksiyonlar apse oluşumuna ve doku hasarına neden olabileceğinden, bu enfeksiyonların tedavisi genellikle etkili antibiyotiklerin uygulanmasını, cerrahi debridmanı ve/veya apse drenajını gerektirir. Ayrıca bu enfeksiyonların birçoğu polimikrobiyal etiyolojiye sahip olduğundan tedavi için antibiyotikleri seçerken, aerobik ve anaerobik spektrumları ve oral veya parenteral formda bulunabilirlikleri dikkate alınmalıdır. Karın içi enfeksiyonların tedavisinde BFG bakterileri ve Gram negatif aerobik bakterileri kapsamı zorunludur. Bazı antibiyotikler sınırlı etkinlik aralığına sahiptir. Metronidazol sadece anaeroplara karşı etkilidir ve bu nedenle karışık enfeksiyonlarda tek başına uygulanamaz. Antibiyotik

seçimini etkileyen ek faktörler ilaçların farmakolojisi, toksisitesi ve mikrobiyota üzerindeki etkisini içerir (15). Kültür sonuçları mevcut olduğunda antibiyotik seçimi daha kolaydır. Fakat bu her zaman mümkün olmaz ve çoğu enfeksiyon ampirik olarak tedavi edilir. Birçok enfeksiyonda yer alan mikroorganizma türleri ve bunların antibiyotik duyarlılık modelleri tahmin edilebilse de antibiyotik direnç paternleri değişebilir ve tedavi sırasında direnç ortaya çıkabilir. BFG'nin duyarlılığı coğrafi olarak ve kurumlar arasında değişmektedir ve geçmişte kullanılan bazı antibiyotikler artık ampirik tedavi için yeterli değildir. Sefoksitin, sefotetan, klindamisin ve moksifloksasin gibi ilaçlara büyük oranda direnç gelişmiştir. BFG'de artan direnç oranları nedeniyle klindamisin artık intraabdominal enfeksiyonlarda önerilmemektedir. Günümüzde en etkili tedavi seçenekleri β -laktam/ β -laktamaz inhibitörleri, karbapenemler, metronidazol, tigesiklin ve kloramfenikoldür. Fakat bu antibiyotiklere karşı da direnç geliştiği, hatta çok ilaca dirençli (ÇİD) izolatların ortaya çıktığı bilinmektedir (73-76). ÇİD BFG bakterilerin bildirilmesi, duyarlılık testlerinin ve antibiyotik yönetiminin önemini vurgulamaktadır (65, 74, 77).

2.6. *Bacteroides fragilis* Grubu'nda Antibiyotik Direncinin Mekanizmaları

BFG bakteriler, diğer tüm anaeroplara gibi, aminoglikozitlere intrinsik dirençlidir. Aminoglikozitlerin bakteri hücresi tarafından alınması, oksijene veya nitrojene bağlı elektron taşıma zincirlerinin varlığını gerektiren iki aşamalı bir işlemdir. Bu mekanizma anaeroplarda bulunmaz. Bu nedenle antibiyotik hedef molekülüne (ribozomun 30S alt birimi) ulaşamaz. Anaeroplara ayrıca fosfomisin, trimetoprim, aztreonam, tüm 1. ve 2. kuşak kinolonlara intrinsik direnç gösterir (68, 78, 79).

2.6.1. Beta-laktam Antibiyotikler

BFG bakteriler, beta-laktam antibiyotiklere karşı dört ana direnç mekanizması sergiler; i) inaktive edici enzimler, özellikle penisilinazlar ve sefalosporinazları içeren β -laktamazlar ii) düşük afiniteli penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler) iii) porin kanalındaki değişiklikler yoluyla azalmış geçirgenlik iv) efluks pompası. En sık gözlenen mekanizma β -laktamaz üretimidir. Kromozomal olarak kodlanan bir penisilinaz enzimi ürettikleri için BFG izolatlarında >%90 penisilin G direnci görülür. Sefalosporinazlar (*cepA* ve *cfxA* genleri tarafından kodlanan) çoğunlukla 2e sınıfına aittir ve klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam tarafından inhibe edilir. PBP'lerdeki

değişiklikler, özellikle PBP1 ve/veya PBP2'deki değişiklikler, BFG türlerinin sefoksitine dirençli mutantlarında β -laktamaz aracılı olmayan sefoksitin direnciyle ilişkilendirilmiştir (80). Diğer beta-laktamlara karşı direnç bölgesel olarak ve türler arasında değişkenlikler göstermektedir. Sefamisinlere ve β -laktam/ β -laktamaz inhibitörlerine karşı direnç oranları *B. fragilis* dışındaki *Bacteroides* türlerinde daha yaygındır (81). Sefoksitin (7-metoksil yan zincirli) ve sefotetan (N-metiltiyotetrazol yan zincirli) gibi sefamisinler, anaerobik enfeksiyonlar için hala uygun tedavi olarak kabul edilebilir (sefalosporinlerin aksine), ancak öncesinde duyarlılık testi yapılması veya direnç düzeyleri hakkında bölgesel epidemiyolojik verilere başvurulması önerilir (68).

Son yıllarda ortaya çıkan önemli bir sorun, *B. fragilis*'te bir metallo-laktamaz enziminin (*cfiA* geni tarafından kodlanan bir karbapenemaz; EDTA tarafından inhibe edilir) üretimidir. Bu izolatlar karbapenemler dahil tüm β -laktamlara karşı dirençlidir. Fenotipik direnç saptanan izolatların sayısından daha fazla *Bacteroides* izolatının bu direnç genini barındırdığı bildirilmiştir (82). Bunun olası nedeni, bu genlerin azalmış karbapenem duyarlılığı sergileyebilecekleri düzeylerde ("sessiz genler") ifade edilmemesidir. Bununla birlikte, tek adımlı bir mutasyonla veya *cfiA* geninin promotor bölgesine bir insersiyon sekansı (IS) eklenmesiyle, bu izolatlar dirençli hale gelebilir. Yakın zamanda *B. xylanisolvens*'te yeni bir karbapenemaz geni (*crxA*) tanımlanmıştır. *CrxA* geni yapısal özellikleri bakımından *cfiA* ile benzer olup, sınıf B bir karbapenemaz kodlamaktadır (83).

Porinlerdeki değişiklikler, teorik olarak olası diğer β -laktam direnç mekanizmasıdır. *B. fragilis*'te saptanan 45-kDa porin benzeri protein ve *B. thetaiotaomicron*'da 70 kDa'lık bir porin potansiyel olarak β -laktam ajanlara direnç ile ilişkilendirilmiştir (84, 85). Ancak bugüne kadar, porin proteinleri ile antibiyotik direnci arasında kesin bir korelasyon gösterilmemiştir (12). Öte yandan, RND (Resistance-Nodulation-Division) tipi efluks pompası *bmeABC1-16*'nin aşırı ekspresyonunun ampisilin, sefoksitin, sefoperazon, imipenem, florokinolonlar, tetrasiklinler, fusidik asit, novobiyoisin, metronidazol, triklosan, sodyum dodesil sülfat ve safra tuzlarının hücre dışına atılmasını sağladığı gösterilmiştir. Ek olarak, efluks pompalarının *B. fragilis*'te homoserin laktonların taşınmasında ve quorum sensing'e aracılık etmede rolü olduğu bildirilmiştir (86-90).

2.6.2. Makrolidler ve Linkozamidler

Makrolidler, bakteriyel ribozomun 23S rRNA molekülüne (50S alt biriminde) bağlanarak, büyüyen peptit zincirinin çıkışını bloke eder ve protein sentezini inhibe eder. Linkozamidler (örn., klindamisin) de 50S ribozomal alt birimine bağlanarak peptidiltransferaz inhibisyonu yapar ve protein sentezini önler. Yaygın olarak kullanılan bir antianaerobik spektruma sahip olan klindamisine direnç son dekatlarda istikrarlı bir şekilde artmıştır. Makrolid–linkozamid–streptogramin B direnç genlerinin homologları, *Bacteroides*'te hem klindamisin hem de eritromisin direnci sağlar. Bu genler, gram-pozitif mikroorganizmalardaki ribozom hedefinin metilasyonu yoluyla dirence neden olan makrolid–linkozamid–streptogramin B direnç genlerine benzer. *Erm* genleri ile kodlanan metilazlar, adenin rezidülerinin metilasyonu ile 23S rRNA'da değişikliğe yol açar ve antibiyotiğin hedef bölgeye bağlanmasını engeller. BFG'de dirençten sorumlu en sık gen *ermF* olmakla birlikte *ermB*, *ermG*, *ermS*, *ermFS*, *ermFU*, *ermA*, *ermC*, *ermE*, *ermQ* ve *erm35* genlerinin varlığı gösterilmiştir (91). Bu genler kromozom ya da plazmid üzerinde yerleşebilir. Plazmidler (pBF4, pBFTM10 (pCP1), pB1136) veya konjugatif transpozonlar (CTnDOT) aracılığıyla transfer edilebilir. Konjugatif transpozonlarda tetrasiklin direnç geni *tetQ* ile *ermF* geninin sıklıkla birlikte yer aldığı ve aktarıldığı bildirilmiştir (92). Bunun yanı sıra *msrSA* ve *mefA* genleri ile efluks pompası aracılı direnç görülebilir (8). *LinA* geni tarafından kodlanan nukleotidiltransferaz ile antibiyotiğin modifikasyonu ve inaktivasyonu bir diğer direnç mekanizmasıdır (93).

2.6.3. Kloramfenikol

Kloramfenikol bakterilerde ribozomal peptidil transferaza bağlanarak protein biyosentezini engeller. *Cat* geni ile kodlanan kloramfenikol asetiltransferaz enzimi, asetil koenzim A'dan bir asetil grubunu kloramfenikolün C-6 pozisyonundaki birincil hidroksile aktararak modifiye edilmiş antibiyotiğin ribozoma bağlanarak etkisini göstermesini engeller (94). BFG'de kloramfenikol direnci nadir olmasına karşın yan etkileri nedeniyle tedavide sık kullanılan bir antibiyotik değildir. Kloramfenikol ile fatal aplastik anemi riski arasındaki ilişkinin yaklaşık tedavi edilen 25.000 ila 40.000 hasta için bir olduğu tahmin edilmektedir. Diğer yan etkiler arasında, yenidoğanlara verildiğinde "gri bebek sendromu" gelişebilmesi, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz

(G6PD) eksikliği olan hastalarda hemolitik anemi ve ilacı uzun süre alanlarda optik nörit gelişmesi sayılabilir (95).

2.6.4. Tetrasiklinler

Tetrasiklinler, ribozomun 30S alt birimine bağlanıp aminoasit-tRNA'nın ribozoma bağlanmasını bloke ederek peptid zincirine yeni aminoasit eklenmesini ve protein sentezini inhibe eder. Günümüzde BFG izolatlarının neredeyse tamamı tetrasikline dirençlidir (>%90). *Tet* genleri ribozomla etkileşime giren ve onu tetrasiklin etkisine karşı koruyan sitoplazmik bir proteini kodlar. *TetQ*, *Bacteroides*'te en yaygın tetrasiklin direnç genidir. Diğer direnç genleri arasında *tetM* ve *tet36* bulunur. *TetA-E* genleri aracılığıyla antibiyotiğin dışa atımı ve enzimatik inaktivasyon (*tetX-tetX1*) diğer direnç mekanizmalarıdır (1, 8, 68).

Tigesiklin yarı sentetik, tetrasiklin türevi, glisilsiklin grubu bir ilaç olup klasik tetrasiklin direnç mekanizmalarından etkilenmemektedir. Komplike cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ve intraabdominal enfeksiyonların tedavisinde ÇİD izolatlarında bir tedavi seçeneğidir. Tigesiklin direnci BFG'de yaygın değildir. Artmış tigesiklin MİK değerleri olan izolatlarda *tetX* ve *tetX1* genlerinin varlığı dikkat çekici bir bulgu olmakla beraber direnç mekanizması net olarak ortaya konmamıştır (96).

Eravasiklin tetrasiklin türevi ve ribozomal koruma, efluks pompası gibi direnç mekanizmalarından etkilenmeyen florosiklin grubu bir antibiyotiktir. Yapılan çalışmalarda tigesiklin ve minosikline göre daha düşük MİK değerlerine sahip olduğu ve tigesiklinden 4-8 kat daha etkili olduğu belirtilmiştir (97, 98).

2.6.5. Kinolonlar

BFG üyeleri 1. ve 2. kuşak kinolonlara dirençli olmakla beraber, 3. ve 4. kuşak kinolonlar antianaerobik etki gösterebilir. Ancak bu amaçla kullanılan moksifloksasine karşı direnç giderek artmıştır. BFG'de kinolon direncinden iki ana mekanizma sorumludur; hedef bölgede değişiklik ve efluks pompaları. Kinolonların hedef bölgesi olan DNA giraz'ın (topoizomeraz II) *gyrA* ve *gyrB* alt ünitelerinde mutasyonlara bağlı olarak BFG'de kinolon direnci meydana gelir (99, 100). Bunun yanı sıra Miyamae ve ark. (101) *B. fragilis*'te norfloksasinin NorA/Bmr'ye (Major Facilitator Superfamily, MFS tipi) benzer bir pompa tarafından dışa atıldığını bildirmiştir. *B. thetaiotaomicron* ve *B. fragilis*, florokinolonları dışarı atan MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) tipi bir efluks pompasına (BexA,

Bacteroides exporter A) sahiptir (102). Ayrıca RND ailesinden bmeABC1-16 pompası kinolon direncine yol açan başka bir mekanizmadır (89).

2.6.6. Nitroimidazoller

Anaeroplara karşı yüksek etkinlik gösteren metronidazol, 5-nitroimidazol türevidir. Metronidazol bir ön ilaç olup bakteri sitoplazmasında pirüvat ferredoksin oksidoredüktaz (PFOR) enzimi ile nitro grubu indirgenerek aktif metabolitlerine dönüşmektedir. Bu metabolitler ise oksidasyon yoluyla DNA'ya hasar vererek hücre ölümüne yol açar. Anaeroplarda metronidazole (ve diğer nitroimidazollere) dirence yol açan tüm mekanizmalar henüz karakterize edilmemiştir. Metronidazol direnci çeşitli ve karmaşık mekanizmaların bir kombinasyonuna bağlı olabilir. En sık öne sürülen mekanizma *nim* genleri ile kodlanan nitroimidazol redüktaz enziminin metronidazolü inaktif amino türevine indirgemesi ve bu sayede antimikrobiyal aktivite için gerekli olan toksik formların oluşumunu önlemesidir. Bugüne kadar *nim* geninin 12 izoformu tanımlanmıştır (*nimA-L*). *NimI* yalnızca *Prevotella baroniae* izolatlarında saptanmıştır. *Nim* genleri kromozomal ya da plazmid yerleşimli olabilir. Bu genlerin varlığı her zaman fenotipik direnci göstermez. Aynı zamanda *nim* geni taşımadığı halde metronidazole dirençli izolatlar da bildirilmiştir (103). Metronidazol direncinde rolü olduğu öne sürülen diğer mekanizmalar ise; bmeRABC5 efluks pompasının aşırı ekspresyonu, DNA onarımında görevli *recA*'nın aşırı ekspresyonu, demir transportunda görevli *FeoAB* geninde mutasyon, *B. thetaiotamicron*'da *rhaR*'nin (ramnoz katabolizması düzenleyici protein) aşırı ekspresyonu ve polimikrobiyal enfeksiyonlarda diğer mikroorganizmaların metronidazolü inaktive etmesidir (104-106).

2.6.7. IS Elemanları

IS elemanları, yalnızca transpozisyon aktivitesinde yer alan proteinleri kodlayan çift sarmallı kısa (600 ila 2000 bp uzunluğunda), ters tekrarlar ile sınırlanan DNA dizileridir. Entegrasyonları sırasında, genellikle hedef bölgede az sayıda nükleotidin duplikasyonuna neden olurlar. Kromozom veya plazmid üzerinde yerleşim gösterebilirler. Uç bölgelerindeki ters tekrarlar ve transpozaz genlerindeki korunmuş aminoasit rezidülerine göre sınıflandırılırlar. IS genlerin promoter bölgesine eklenerek ekspresyonunu uyarabilir. IS elemanlarının BFG'de *cepA*, *cfxA*, *cfiA*, *crxA*, *ermF* ve *nim* genlerinin aktivasyonunda rolü olduğu gösterilmiştir (107).

BFG izolatlarında %1.5 ila %19 arasında ÇİD oranları bildirilmektedir (74, 108, 109). ÇİD izolatlardaki direnç modelleri, farklı merkezlerde ve ülkelerde büyük farklılıklar gösterebilir. ÇİD BFG izolatları ile ilişkili enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri büyük ölçüde azalmaktadır (110, 111).

2.8. *Bacteroides fragilis* Grubu'nda Antibiyotik Duyarlılık Testleri (ADT)

2.8.1. Duyarlılık Testlerinin Uygulanmasını Gerektiren Durumlar

Anaerobik bakterilerde, ADT'nin ne ölçüde gerçekleştirilmesi gerektiği tartışılmaya devam eden bir konudur. Anaerobik ADT her zaman isteğe bağlı kalmıştır ve bu enfeksiyonlarda genellikle ampirik tedavi kullanılmaktadır. Karar verme sürecinde deneyimin rolü olmakla birlikte aşağıdaki durumlarda saf kültürde üretilen klinik olarak anlamlı anaerob bakterilere ADT uygulanması önerilmektedir (77, 112, 113).

- (a) Steril vücut bölgesinden izole edilen ve kontaminant olmayan bakteriler
- (b) Bakteriyemi, endokardit, beyin apsesi gibi ciddi ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlar
- (c) Ampirik tedavi seçiminde karar verilemeyen durumlar
- (c) Ampirik tedaviye yanıt vermeyen enfeksiyonlar
- (d) Başlangıçta ampirik tedaviye/aerobik tedaviye yanıt alınsa da relaps görülen enfeksiyonlar
- (e) Septik artritis, osteomyelitis, drenaj yapılamayan apse, greft/protez enfeksiyonu gibi uzun süre tedavi gerektiren durumlar
- (f) Bir antibiyotiğin hastanın klinik durumu açısından kritik role sahip olduğu durumlar
- (g) Antibiyotik duyarlılık profili tahmin edilemeyen/antibiyotik direncinin potansiyel olarak yüksek olabileceği virülansı yüksek izolatlar: örneğin BFG, *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp., *Sutterella wadsworthensis*, *Bilophila wadsworthia*, and *C. perfringens* dışındaki *Clostridium* türleri
- (h) Duyarlılık paterni iyi bilinmeyen bakteriler
- (i) Duyarlılık profillerinin saptanarak ampirik tedaviye yön verilmesi amacıyla epidemiyolojik veri toplanması için

Anaerobik enfeksiyonların çoğu, hem β -laktamaz-pozitif hem de β -laktamaz-negatif izolatlar ile gelişen polimikrobiyal enfeksiyonlardır. Polimikrobiyal anaerobik enfeksiyonlarla tüm izolatlar için test gerekli olmayabilir. Bununla birlikte, duyarlılık

testi isteniyorsa, en azından dirençli olma olasılığı en yüksek olan organizma (örn. BFG) test edilmeli ve sonuçlar bildirilmelidir (114).

2.8.2. Duyarlılık Testlerinde Kullanılması Önerilen Antibiyotikler

Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) tarafından gram negatif anaerob bakterilerde test edilmesi önerilen antibiyotikler Tablo 2.1.'de yer almaktadır (115). Güncel Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) sınır değer tablosunda yer alan antibiyotikler ise klindamisin, meropenem, metronidazol ve piperasilin/tazobaktamdır (116).

Tablo 2.1. Gram negatif anaerob bakterilerde test edilmesi ve raporlanması önerilen antibiyotikler

1. Basamak*	2. Basamak**	3. Basamak***	4. Basamak****
Amoksisilin- klavulanat Ampisilin- sulbaktam Piperasilin- tazobaktam			Penisilin Ampisilin
Klindamisin			Sefoksitin Sefotetan
Ertapenem İmipenem Meropenem			Seftriakson
Metronidazol			Moksifloksasin
			İmipenem-relebaktam
<i>*Rutin birincil test ve raporlama için uygun antibiyotikler</i> <i>**Rutin, birincil testler için uygun olan ancak her kurumda oluşturulan kademeli raporlama kurallarına göre rapor edilebilecek antibiyotikler</i> <i>***Çok ilaca dirençli mikroorganizmalar için yüksek risk altındaki hastalara hizmet veren kurumlarda rutin, birincil testler için uygun olan ancak yalnızca her kurumda oluşturulan kademeli raporlama kurallarına göre rapor edilmesi gereken antibiyotikler</i> <i>****Diğer basamaklardaki antibiyotiklerin çeşitli faktörler nedeniyle uygun olmaması durumunda klinisyenin talebi üzerine test edilebilecek ve raporlanabilecek antibiyotikler</i>			

2.8.3. Duyarlılık Test Yöntemleri

2.8.3.1. Agar Dilüsyon Yöntemi

Agar dilüsyon anaerop ADT için altın standart test yöntemidir. Test edilecek antibiyotiğin iki kat seri dilüsyonlarını içeren katı besiyerleri kullanılır. CLSI bu amaçla hemin (5 µg/ml), vitamin K (1 µg/ml) ve %5 defibrine koyun kanı içeren Brucella agarın; EUCAST ise %5 defibrine at kanı içeren Fastidious Anaerobe Agar (FAA)'ın kullanılmasını önermektedir (114, 117). Hazırlanan antibiyotikli plaklar 2 °C – 8 °C'de kapalı plastik torbalarda rutin testler için bir hafta, araştırma amaçlı testler için üç gün süreyle saklanabilir. İmipenem, klavulanik asit içeren kombinasyonlar gibi stabilitesi iyi olmayan antibiyotiklerle hazırlanan plaklar aynı gün kullanılmalıdır.

İnokulum hazırlanması için doğrudan koloni süspansiyon yöntemi veya buyyon kültürü yöntemi kullanılabilir. Bakteri süspansiyonları indikatörsüz tiyoglikolat buyyon/supplementli beyin kalp infüzyon buyyon/Schaedler buyyon/Brucella buyyon içinde 0.5 McFarland standartına göre hazırlanarak agar yüzeyine son inokulum 10^5 KOB/damlatma olacak şekilde inoküle edilir. İnokulumlar kuruduktan sonra, 30 dakika içinde, plaklar ters çevrilerek anaerobik atmosfere yerleştirilir.

Plaklar $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 42-48 saat inkübasyonun ardından görsel olarak incelenir. Mikroorganizmanın üremesinin inhibe olduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak belirlenir. Ek olarak; her seride biri aerobik kontaminasyonun belirlenmesi için aerob ortama, diğeri üreme kontrolü için anaerop ortama konmak üzere iki kontrol plağına antibiyotikli plaklardan önce ve sonra inokülasyon yapılır (114). Agar dilüsyon çok sayıda izolatu test etmek için veya sürveyans çalışmaları için tercih edilen bir yöntemdir. Ancak emek yoğun, ekonomik olmayan ve tek/az sayıda izolatu test edilmesi için uygun olmayan bir yöntemdir. Replikatörler kullanılamıyorsa yöntemin süresi daha da uzamaktadır. Bu kısıtlılıklar nedeniyle rutin tanı laboratuvarları tarafından sık tercih edilmeyen bir yöntemdir (65, 77, 112).

2.8.3.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon (SMD) 96 kuyucuklu, U tabanlı test edilecek antibiyotiğin iki katlık seri dilüsyonlarını içeren mikrop plaklarda yapılmaktadır. Besiyeri olarak hemin (5 µg/mL), vitamin K₁ (1 µg/mL) ve %5 lize at kanı ilave edilmiş Brucella buyyon kullanılmaktadır. Kuyucuklardaki sıvı miktarının en az 100 µL olmasına

dikkat edilmelidir. Mikroplaktaki son inokulum miktarı 10^6 KOB/mL olmalıdır. Hazırlanan plaklar anerobik ortamda $36\pm1^\circ\text{C}$ 'de 46-48 saat inkübe edilir. ADT sonuçlarının okunması ve değerlendirilmesi görsel veya fotometrik olarak yapılabilir. Bu yöntem CLSI tarafından yalnızca *Bacteroides* spp. ve *Parabacteroides* spp. türleri için önerilmektedir. Diğer anaerop bakteriler SMD plağında zayıf, homojen olmayan veya tutarsız üreme göstermektedir. EUCAST rehberinde ise SMD yöntemi yer almamaktadır. SMD plaklarının in-house hazırlanması durumunda test edilecek antibiyotikler ve konsantrasyon aralığı laboratuvarın ihtiyacı ve isteği doğrultusunda hazırlanabilir. Hazırlanan plaklar kapalı plastik ambalajlarda $\leq -20^\circ\text{C}$ 'de (tercihen $\leq -60^\circ\text{C}$ 'de birkaç ay stabil şekilde saklanabilir. Bazı antibiyotikler (örn.; klavulanik asit ve imipenem) diğerlerine göre daha labildir ve $\leq -60^\circ\text{C}$ 'de saklanmalıdır (114). Mikrodilüsyon plaklarının ticari olarak da temin edilmesi mümkündür. Bu ticari paneller dondurulmuş/havada kurutulmuş formlarda satılmaktadır. Bu paneller temel olarak aynı SMD ilkesine dayalıdır; ancak aralarında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Yaygın olarak kullanılan ticari panellerden Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı Thermo Scientific™ Sensititre™ Anaerop MİK plaklarında (Trek Diagnostic Systems, Thermo Fisher Scientific, ABD) Brucella buyyon kullanılmaktadır. MICRONAUT-S Anaerop MİK plaklarında ise [(Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim, Almanya) (CE/IVD sertifikalı)] Wilkins-Chalgren besiyeri kullanılmaktadır (118-120).

Bir çalışmada agar dilüsyon ile karşılaştırıldığında tek bir izolatın test edilmesi durumunda in-house panel ile 20,5 kat, ticari panel ile 5,8 kat maliyet düşüşü görülmüştür. Ancak, 30 izolatı test etmenin maliyeti ticari SMD plakaları ile 8,4 kat artmış, in-house SMD paneli ile yalnızca 1,03 kat azalmıştır. Bu nedenle in-house SMD panelleri az sayıda izolatın test edilmesi için kaynakları kısıtlı laboratuvarlarda kullanılabilir (77, 121).

2.8.3.3. Gradient Difüzyon Yöntemi

Gradient test, gradient difüzyon şeritlerini ve spiral gradient yöntemlerini kapsamaktadır. Gradient difüzyon şeritlerinin bir yüzünde gradient oluşturacak şekilde yerleştirilmiş antibiyotik konsantrasyonları, diğer yüzünde ise konsantrasyonu gösteren sayılar bulunur. Zenginleştirilmiş tiyoglikolat buyyon veya steril serum fizyolojik içinde üretici firmanın anaeroplara için önerdiği şekilde inokulum hazırlanır.

Ardından inokulum eküvyon ile agar yüzeyine yayılır ve antibiyotikli şeritler plağa yerleştirilir. Plaklar anerobik ortamda $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ 'de 48 saat inkübasyonun ardından okunur (122). Ancak, *Bacteroides* spp. gibi hızlı üreyen anaeroplarda 24 saat sonra okuma yapılabileceği belirtilmektedir (123). Gradient difüzyon yöntemi ile MİK saptanabilir ve referans agar dilüsyon yöntemi ile uyumu genellikle yüksektir (123-125). Ancak klindamisin ve amoksisilin-klavulanik asit ile yanlış duyarlı, metronidazol ile ise yanlış dirençli sonuçlar alınabileceği bildirilmiştir (125-127). Gradient difüzyon yöntemi heterodirençli izolatların tespitini de sağlayabilir (128). Az sayıda izolatın test edilmesi için uygun ve pratik bir yöntem olmasına karşın maliyetinin yüksek olması en büyük dezavantajıdır.

Autoplate 4000 (Advanced Instruments, Inc., Boston, MA) spiral gradient endpoint (SGE) sistemi 150 mm'lik agar plağına spiral düzende stok antibiyotik solüsyonu dağıtan bir sistemdir. Böylece plağın merkezinden çevresine doğru azalan bir konsantrasyon gradienti oluşur. Antibiyotiklerin difüzyonunun ardından test edilecek izolatların süspansiyonu agar yüzeyindeki inokulum miktarı 10^5 KOB/mL olacak şekilde otomatik inokülatör yardımıyla ya da manuel olarak besiyeri yüzeyine radyal çizgiler şeklinde ekilir. Aynı plakta birden fazla bakteri test edilebilir. İnkübasyon sonrası üremenin bittiği noktalar işaretlenir ve merkeze olan mesafesi (tail-ending radius, TER) milimetre cinsinden ölçülür. Üremenin belirgin şekilde sonlanmadan silik bir üreme şeklinde devam ettiği durumlarda (özellikle gram negatif anaerop bakteriler ve beta-laktam ilaç kombinasyonunda görülen bir durum) üreme karakterinin belirgin olarak değiştiği nokta ile merkez arasındaki mesafe (tail-beginning radius, TBR) ölçülür. Elde edilen değerler üretici firmanın sağladığı yazılım programına girilir ve program tarafından bir tail-ending konsantrasyonu (TEC) hesaplanır. TEC değeri konvansiyonel duyarlılık testleriyle karşılaştırılması için kendisine en yakın iki katlık dilüsyona yuvarlanır. Yapılan çalışmalarda bu yöntemin agar dilüsyon ile uyumu yüksek bulunmuştur (129-131). Ayrıca düşük olan konsantrasyonda üremeyip daha yüksek konsantrasyonda üreyen dirençli kolonileri de tespit edebilir. Agar dilüsyona göre gereken malzeme miktarı daha az ve daha kısa sürede uygulanabilen bir yöntemdir. Dezavantajı ise özel cihaz ve yazılım gerektirmesi nedeniyle pahalı olmasıdır (77).

2.8.3.4. Disk Difüzyon Yöntemi

Geçmişte anaerop bakterilerde disk difüzyon yöntemini araştıran çeşitli çalışmalar olsa da sonuçların tekrarlanabilirliği ve MİK değerleriyle korelasyonu ile ilgili sorunlar saptanmıştır (132-136). Brucella kanlı agarın kullanıldığı bir çalışmada ilk denemede umut vaat eden sonuçlar alınmış ancak farklı üreticilere ait agarlarda tutarsızlıklar olduğu tespit edilmiştir (134). Fastidious Anaerobe Agar (FAA)'nın içerdiği ilave peptonlar sayesinde Brucella kanlı agar, Wilkins-Chalgren agar ve beyin kalp infüzyon agara göre anaeroplara üremesini daha iyi desteklediği gösterilmiştir (137). Yakın zamanda Bavelaar ve ark. (138) ve EUCAST Geliştirme Laboratuvarı %5 defibrine at kanlı FAA kullanarak disk difüzyon yöntemini *Bacteroides* spp. için valide etmiştir. Daha sonra hızlı üreyen ve sık izole edilen *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens* ve *Cutibacterium acnes* için de disk difüzyon yönteminin uygun olduğu gösterilmiştir (139). Bu araştırmalarla birlikte anaerop bakteriler için disk difüzyon yöntemi EUCAST rehberine girmiştir (116). Önerilere göre 1 McFarland standardına göre hazırlanan bakteri süspansiyonu %5 defibrine at kanı içeren FAA yüzeyine yayılır. Diskler yerleştirildikten sonra plaklar anaerobik atmosferde, 35-37 °C'de 18±2 saat inkübe edilir. İnkübasyonun ardından inhibisyon zon çapları, petri kutularının kapakları çıkarılmış ve plaklar yansıyan ışıkla aydınlatılmış halde plağın ön yüzünden ölçülür (117). Okumanın daha iyi şekilde yapılması için EUCAST'ın Anaerop Bakterilerde Disk Difüzyon Okuma Rehberi'ne başvurulabilir (117). Sonuçlar EUCAST Sınır Değer Tabloları'na göre değerlendirilir (116). Disk difüzyon ucuz, kolay uygulanabilen bir yöntem olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda kullanıma çok uygundur. Dezavantajı MİK değeri saptanamaması ve güncel durumda her anaerop bakteri ve antibiyotik için sınır değer bulunmamasıdır. Ancak sınır değer bulunan bakteri türlerinin ve antibiyotiklerin sayısının artırılması için EUCAST'ın çalışmaları devam etmektedir.

2.8.3.5. MALDI-TOF MS

Hızlı sonuç alınması nedeniyle son yıllarda MALDI-TOF MS ile antimikrobiyal direnç belirleme konusunda ilgi artmıştır (140). Aeroblara kıyasla daha az sayıda olmasına karşın anaerop bakterilerde antibiyotik direnç belirlenmesi için MALDI-TOF MS'in potansiyel kullanımına dair çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, en sık kullanılan tür *B. fragilis*'tir.

B. fragilis'te karbapenemler dahil tüm β -laktamlara dirence neden olan *cfiA* geni pozitif izolatlar ile negatif izolatlar arasındaki spektrum farklılığı sayesinde MALDI-TOF MS'in bu izolatları birbirinden ayırt edebileceği bildirilmiştir (6, 12, 70, 141-145). *CfiA* tespiti için uygulanan prosedür tanımlama için kullanılan farklı değildir, ancak ayrı bir yazılım kullanılması ve analiz sırasında bu yazılımın seçilmesi gerekmektedir. Önemli bir nokta, optimal *cfiA* ekspresyonu için "upstream" bölgesine IS eklenmesi gerektiği için *B. fragilis* izolatlarında tek başına *cfiA* pozitifliğinin saptanmasının her zaman fenotipik karbapenem direnci olduğunu göstermemesidir. MALDI-TOF MS ile karbapenem hidroliz aktivitesinin gösterilmesi başka bir direnç saptama yöntemidir. Karbapenem molekülünün karbapenemaz enzimi tarafından hidrolizi antibiyotik molekülünde bir kütle değişikliği ile sonuçlanır. Bu kütle değişikliği MALDI-TOF MS'te doğal antibiyotik piki ve hidrolize olan antibiyotik piki arasında farklılık olmasına neden olur ve bu şekilde karbapenemaz üreten izolatlar saptanabilir (146). Bu teknoloji ile β -laktamaz üretiminin saptanması da mümkündür (147).

MALDI Biotyper Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay (MBT-ASTRA) yönteminde ise antibiyotikli ve antibiyotiksiz ortamda inkübe edilen *B. fragilis* süspansiyonlarının MALDI-TOF spektrumları karşılaştırılarak rölatif üreme hesaplanır. Dirençli ve duyarlı izolatlar arasındaki rölatif üremede belirgin farklılıklar bulunması nedeniyle dirençli izolatlar tespit edilebilir (148).

2.8.3.6. Moleküler Yöntemler

Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) antibiyotik direnç belirteçlerini başarılı şekilde saptayabilir. WGS ile yeni direnç belirteçleri de tespit edilebilir. Bu yöntemler ile kültürden bağımsız şekilde direnç araştırılabilir. Ancak dirençli genotipler her zaman fenotipik direnç ile örtüşmez. MİK değeri elde edilememesi ve yüksek maliyet nedeniyle rutin laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılamaması diğer dezavantajlarıdır. Bu testler genellikle direnç mekanizmalarının araştırıldığı referans laboratuvarlarda kullanılmaktadır (77, 112).

2.8.3.7. Beta Laktamaz Testi

Anaerobik bakterilerde β -laktamaz varlığı nitrosefin diski gibi kromojenik sefalosporin testi ile tespit edilebilir. Basit ve hızlı sonuç veren kolorimetrik testlerdir. Test üretici firmanın talimatlarına göre yapılır. Tedavide penisilin ya da ampisilin

kullanılması düşünülüyorsa faydalıdır. BFG izolatlarının büyük çoğunluğu β -laktamaz üretir; bu nedenle bu grup için β -laktamaz testi yapılması ve raporlanması önerilmez. BFG izolatları penisilin, ampisilin ve amoksisiline dirençli kabul edilmeli ve tedavide bu ajanlar kullanılmamalıdır. Diğer türler ise daha az öngörülebilir paterne sahiptir ve bazı anaeroplara (örneğin bazı *Clostridium*, *Fusobacterium* ve *Prevotella* türleri) β -laktamaz nedeniyle penisilin ve ampisiline dirençli olabilir. Pozitif β -laktamaz testi olan izolatlar ek bir teste ihtiyaç duyulmadan penisilin ve ampisiline dirençli olarak raporlanmalıdır. Ancak negatif test kesin olarak duyarlılığı göstermez. Bazı anaeroplara PBP'de değişiklik veya dışa atım pompaları sayesinde β -laktam antibiyotiklere direnç gösterebilir (114). Bu konuda yapılan çalışma sayısı sınırlı olduğu için bu mekanizmalara sahip izolatların yüzdesi bilinmemektedir. Bu yöntemin diğer kısıtlılığı pigmentli anaerob bakterilerde değerlendirmenin güç olmasıdır (149).

2.8.3.8. Karbapenemaz Testi

B. fragilis'te karbapenemaz üretimini tespit etmek için Enterobacterales ve *Pseudomonas aeruginosa*'da kullanılan modifiye karbapenemaz inaktivasyon metodunu (CIM) temel alan bir anaerobik karbapenemaz inaktivasyon metodu (Ana-CIM) geliştirilmiştir (150). Ana-CIM yönteminde *B. fragilis* izolatları ilk alanda 10 μ g meropenem diski olan (selektif baskıyı sağlamak için) Brucella kanlı agarda, anaerobik atmosferde, 35°C'de 24-48 saat inkübe edilir. Daha sonra 5 mL Brucella buyyon içeren bir tüpe yeni bir 10 μ g meropenem diski konur. Oda ısısında 15 dk bekletilerek antibiyotiğin dağılımı sağlanır. Katı besiyerinde meropenem diskine en yakın üreyen koloniler alınarak Brucella buyyon içinde 1 McFarland standardına ulaşacak şekilde süspanse edilir. Bu süspanسیونlar anaerobik ortamda, 35°C'de, 6 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra steril öze ile meropenem diski tüpten çıkarılır ve 0.5 McFarland *Escherichia coli* ATCC 25922 yayılmış 150 mm'lik Mueller-Hinton agara (MHA) yerleştirilir. Bir plağa en fazla 8 disk yerleştirilebilir. MHA plakları aerobik ortamda 35 °C'de 18 saat inkübe edilir. Daha sonra yansıyan ışıktaki meropenem diski etrafındaki zon çapları ölçülür. CLSI M100 Ed30 tarafından yorumlanan gradient test ile yapılan karbapenem duyarlılığı ile karşılaştırıldığında, Ana-CIM ile *B. fragilis*'te %87 (52/60) kategorik uyum (KU) ve %0 (0/21) çok büyük hata (ÇBH), %11 (4/36) büyük hata (BH) ve %7 (4/60) küçük hata (MH) bulunmuştur.

Modifiye ANA-CIM yönteminde 600 nm’de optikal dansite ~6 olacak şekilde inokulum hazırlanır. Buyyon içinde diskle birlikte bakterinin inkübasyon süresi 2 saattir. Negatif kontrol olarak %0.85 NaCl içinde bekletilen bir disk kullanılır. Test izolatu ile negatif kontrolün zon çapları arasındaki fark ≥ 2 mm ise test pozitif kabul edilir. Araştırmacılar bu yöntem ile *cfiA* (+) ve *cfiA* (-) izolatların tümünü doğru şekilde ayırt etmişlerdir (151).

Çift uçlu gradient test stripleri (meropenem $\pm$ EDTA, imipenem $\pm$ EDTA) karbapenemaz tespiti için araştırılan bir diğer yöntemdir. Ancak kullanılan karbapenem türüne ve izolatların direnç düzeyine göre değişkenlik yüksektir. Meropenem $\pm$ EDTA ve imipenem $\pm$ EDTA’nın *cfiA* pozitif *B. fragilis* izolatlarında duyarlılıkları sırasıyla %87 ve %27 olarak rapor edilmiştir (152, 153).

B. fragilis’te karbapenemaz tespiti için bir çalışma, Carba-NP testinin, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile upstream IS ve *cfiA*’nın varlığının belirlenmesine kıyasla karbapenemaz aktivitesini $>90\%$ duyarlılık ve özgüllükle saptadığını bildirmektedir (154). Yakın tarihli bir çalışmada, MİK değerlerine göre duyarlı olsalar dahi *cfiA*-pozitif tüm izolatlarda CARBA-NP testi pozitif sonuç vermiştir (155). Başka bir çalışmada CARBA NP testi 27 *B. fragilis* izolatında değerlendirilmiş, *cfiA* (+) ve imipeneme dirençli iki izolatta pozitif, *cfiA* (+) ve imipenem orta duyarlı bir izolatta negatif bulunmuştur. İmipenem duyarlı, *cfiA* negatif izolatlarda ise CARBA NP negatif sonuç vermiştir (156). Bununla birlikte, başka bir çalışma, meropenem MİK aralığı 1-32 $\mu\text{g/mL}$ olan 29 *cfiA* (+) izolattan yalnızca 6’sının Carba-NP ile karbapenemaz pozitif olduğunu ve bunlardan 5’inin 16 $\mu\text{g/mL}$ meropenem MİK değerine sahip olduğunu tespit etmiştir. Yirmi üç (%79) izolatta kombinasyon disk testi pozitif iken, 29 izolatu tamamı MALDI-TOF bazlı bir yöntemle (STAR-Carba) karbapenemaz pozitif saptanmıştır. Araştırmacılar hem Carba-NP hem de kombinasyon disk testi ile karbapenemaz tespitinin meropenem MİK’e bağlı olduğunu ileri sürmektedir (146).

Bu fenotipik yöntemler dışında, PZR veya MALDI-TOF MS ile *cfiA* geninin tespiti karbapenemaz varlığı yönünden uyarıcı olabilir, ancak *cfiA*’nın sessiz olabileceği ve varlığının her zaman fenotipik karbapenemaz üretimini göstermeyeceği akılda tutulmalıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. İzolatların Toplanması ve Saklanması

Çalışmaya 01.07.2018–30.06.2022 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesi'ne gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 138 BFG izolatu dahil edilmiştir. Çalışma Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22.09.2020 tarihli onayı ile yapılmıştır (Sayı: 16969557-1456). BFG izolatları kan (n=65), püy/apse (n=43), doku (n=14), periton sıvısı (n=13), plevra sıvısı (n=3) örneklerinden izole edilmiştir. Aynı hastada aynı türe ait ardışık üreme olması durumunda yalnızca ilk üreyen izolat çalışmaya alınmıştır. Örnek türü ve örnek tarihi bilgilerine Hacettepe Hastanesi'nde kullanılan Laboratuvar Bilgi Sistemi'nden (LBS) ulaşılmıştır.

İzolatların yeniden canlandırılması için -80°C'de derin dondurucuda %20 gliserol içeren tiyoglikolat sıvı besiyerinde stoklanmış kültürlerden hemin (5 µg/ml), vitamin K (1 µg/ml) ve %5 defibrine koyun kanı içeren Brucella agara (BD, ABD) ekim yapılarak en az iki kere pasajlanmış ve saflıkları kontrol edilmiştir. Ekim yapılan plaklar ticari olarak temin edilen GasPak (Thermo Fisher Scientific, ABD) içeren anaerob kavanozda (Oxoid, İngiltere) 36±1 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatların tanımlanması MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonik Microflex LT kütle spektrometre cihazı, Almanya) ile yapılmıştır. Bruker Daltonik IVD bakteri test standardı (ref no: 8290190) MALDI-TOF MS cihazının kalibrasyonu ve bakterilerin tanımlama kontrolü için kullanılmıştır. MALDI-TOF MS'de tanımlanması istenen izolatların kolonilerinden bir miktar alınarak metal plaklar üzerindeki kuyucuklara sürüldükten sonra üzerlerine 1 µl matriks solüsyonu (α-siyano-4-hidroksisinnamik asit) eklenmiş ve kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra MALDI-TOF MS cihazı ile proteinlerin kütle farklılığına göre analizöre ulaşan verileri cihazın kütüphanesi ile karşılaştırarak tanımlama yapılmıştır. Üretici firmanın önerilerine göre log skoru ≥2.0 olan bakteriler tür düzeyinde, 1.7-2.0 arasında olan bakteriler cins düzeyinde tanımlanmıştır.

3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İn vitro antibiyotik duyarlılık testleri CLSI'nın Anaerobik Bakterilerin Antimikrobiyal Duyarlılık Test Yöntemleri M11 Rehberi 9.basımına göre yapılmıştır (114).

3.2.1. Stok Solüsyonların Hazırlanması

Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan ampisilin (Sigma-Aldrich, ABD), sefoksitin (Sigma-Aldrich, ABD), piperasilin (Sigma-Aldrich, ABD), tazobaktam (Sigma-Aldrich, ABD), klindamisin (Sigma-Aldrich, ABD), tigesiklin (Sigma-Aldrich, ABD), metronidazol (Sigma-Aldrich, ABD) ve meropenem (Abcr GmbH, Almanya) toz şeklinde temin edilmiştir. Çözücü olarak ampisilin için fosfat tamponu (pH 8.0, 0.1 mol/L), imipenem için fosfat tamponu (pH 7.2, 0.01 mol/L), metronidazol için dimetil sülfoksit (DMSO), diğer antibiyotikler için steril distile su kullanılmıştır. İlaç tozuna ait üretici firmanın bildirdiği potens göz önüne alınarak ve “Çözücü Hacmi (mL)= Ağırlık (mg) x Potens (µg/mg) / stok antibiyotik konsantrasyonu (µg/mL)” formülü kullanılarak istenen konsantrasyonda stok solüsyonları hazırlanmıştır. Buna göre stok çözeltileri ampisilin 5120 µg/mL, sefoksitin 5120 µg/mL, piperasilin 5120 µg/mL, tazobaktam 1600 µg/mL, klindamisin 6400 µg/mL, tigesiklin 6400 µg/mL, metronidazol 6400 µg/mL, meropenem 2560 µg/mL, imipenem 2560 µg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan antibiyotik stok solüsyonları steril mikrosantrifüj tüplerine bir seferde kullanılacak hacimlerde bölünüp -80 °C’de saklanmıştır. Stok çözeltiler 6 ay içinde kullanılmıştır ve her biri kullanım öncesi yalnızca bir kez eritilmiştir.

3.2.1. Agar Dilüsyon Plaklarının Hazırlanması

Duyarlılık testi için hemin (5 µg/ml), vitamin K (1 µg/ml) ve %5 defibrine koyun kanı içeren Brucella agar kullanılmıştır. Test edilecek antibiyotik için MİK aralığı belirlenmesinde American Type Culture Collection (ATCC) *B. fragilis* 25285 kalite kontrol izolatının beklenen MİK aralığı ve CLSI'nın duyarlı (S)/dirençli (R) sınır değerleri dikkate alınmıştır. Antibiyotik stok solüsyonu -80 °C’lik dondurucudan çıkarılarak oda sıcaklığına getirilmiştir. Uygun çözücü kullanılarak son konsantrasyonun 10 katı olacak şekilde seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan 2 mL antibiyotik, 18 mL besiyeri oranında olacak şekilde 90 mmlik petri plaklarına aktarılmış ve dairesel hareketlerle karıştırılarak homojenize edilmiştir.

Ek olarak üreme kontrolünde kullanmak amacıyla antibiyotik içermeyen, bunun yerine antibiyotik hacminde steril distile su eklenmiş plaklar hazırlanmıştır. Hazırlanan plaklar aynı gün kullanılmıştır. Test edilen antibiyotik konsantrasyonları, çözücü ve sulandırıcı solüsyonların listesi Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Agar dilüsyon testinde çalışılan antibiyotiklerin çözücü, sulandırıcı solüsyonları ve test edilen MİK aralığı (µg/mL)

Antibiyotik	Çözücü	Sulandırıcı	MİK Aralığı (µg/mL)
Ampisilin	Fosfat tamponu, pH 8, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu, pH 6, 0.1 mol/L	0.06–256
Sefoksitin	Su	Su	0.5–256
Piperasilin/tazobaktam	Su	Su	0.06/4–256/4
İmipenem	Fosfat tamponu, pH 7.2, 0.01 mol/L	Fosfat tamponu, pH 7.2, 0.01 mol/L	0.015–128
Meropenem	Su	Su	0.015–128
Klindamisin	Su	Su	0.25–32
Metronidazol	Dimetil sülfoksit (DMSO)	Su	0.12–64
Tigesiklin	Su	Su	0.12–32
Linezolid	Su	Su	0.06–64

3.2.2. Bakteri İnokulumu Hazırlanması ve İnokülasyon

İnokulum, 48 saatlik Brucella agar kültüründen, Brucella buyyon içerisinde 0.5 McFarland (1.5×10^8 KOB/ml) standart bulanıklıkta olacak şekilde, doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi ile hazırlanmıştır. Agar plakları inokulumların sırasına göre işaretlenmiştir. Bakteri inokulumları steril edilebilen 21 metal kuyucuklu, 3 mm çapında iğneleri olan ve 2 µL damlatabilen replikatörlere sahip agar dilüsyon cihazı (multipoint inoculator, Jencons, UK) ile eş zamanlı olarak agar yüzeyine aktarılmıştır (Şekil 3.1.). Öncelikle antibiyotik içermeyen aerob ve anaerob üreme kontrol plaklarına, daha sonra düşük konsantrasyondan yükseğe doğru antibiyotikli plaklara ekim yapılmıştır.

Tüm duyarlılık testlerinde kalite kontrol kökeni olarak ATCC *Bacteroides fragilis* 25285 kullanılmıştır.

3.2.3. Agar Dilüsyon Plaklarının İnkübasyonu

Agar dilüsyon plakları inokulumların kurumasını takiben ters çevrilerek anaerop kavanoza yerleştirilmiştir. GasPak yerleştirilen kavanoz 36 ± 1 °C’de 42-48 saat anaerobik atmosferde (%80-90 N₂, %5-10 H₂, %5-10 CO₂) inkübe edilmiştir. Aerop üreme kontrolü için ekim yapılan plak CO₂’li etüvde 36 ± 1 °C’de 42-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında anaerobiozisin kontrolü için rezasurin indikatör strip (Oxoid, İngiltere) kullanılmıştır.

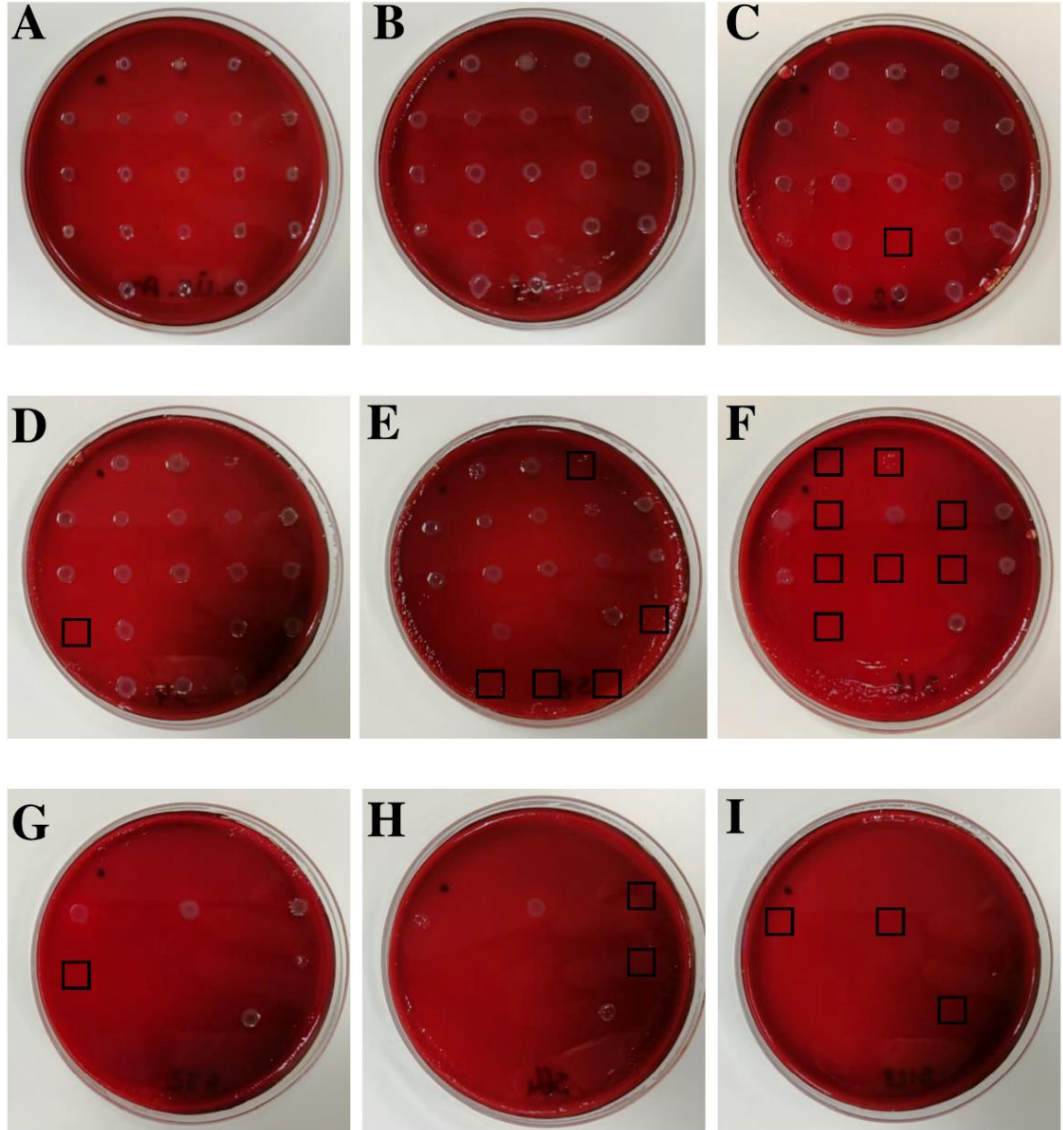


Şekil 3.1. Agar dilüsyon cihazı ile bakteri inokulumlarının plaklara inokülasyonu.

3.2.4. Agar Dilüsyon Plaklarının Okunması ve Değerlendirilmesi

İnkübasyon sonrası plaklar MİK’lerin belirlenmesi amacıyla açık renkli, ışığı yansıtmayan bir yüzey üzerine yerleştirilmiştir. Aerop ortamda inkübe edilen plaklar kontaminasyon olup olmadığını saptamak amacı ile kontrol edilmiştir. Kontaminasyon olduğu düşünülen izolatlar tekrar çalışmaya alınmıştır. Anaerop ortamda inkübe edilen

üreme kontrol plağında üreme olup olmadığı değerlendirilmiştir. Üreme kontrol plağında üremeyen izolatlar tekrar çalışmaya alınmıştır. Plaklar düşük antibiyotik konsantrasyonu içeren plaktan yükseğe doğru okunmuştur. Üremeyi inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak kaydedilmiştir; CLSI M11 (9.basım) rehberinin öneriler doğrultusunda inokülumun neden olduğu üreme benzeri iz, 1-3 adet normal büyüklükte veya <10 çok küçük koloni üremesi dikkate alınmamıştır (Şekil 3.2.) (114).



Şekil 3.2. : Agar dilüsyon yöntemi ile MİK belirlenmesi: A, Üreme kontrol plağı; B-I, Sefoksitin içeren plaklar (B, 1 µg/mL; C, 2 µg/mL; D, 4 µg/mL; E, 8 µg/mL; F, 16 µg/mL; G, 32 µg/mL; H, 64 µg/mL; I, 128 µg/mL).

MİK değerleri CLSI rehberinin standartları doğrultusunda yorumlanmıştır (115). CLSI kılavuzunda tigesiklin için sınır değer olmadığından sonuçlar FDA sınır değerine göre yorumlanmıştır (157). Kullanılan sınır değerler Tablo 3.2.'de gösterilmiştir. Anaeroplara için sınır değer bulunmayan linezolid için ise MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri belirlenmiştir. MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla izolatların %50'sini ve %90'ını inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır.

Tablo 3.2. Anaerop bakteriler için antibiyotik sınır değerleri

Antibiyotik	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285 MİK Aralığı (µg/mL)	Kategoriler ve MİK Sınır Değerleri (µg/mL)		
		Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Ampisilin	16–64	≤0.5	1	≥2
Sefoksitin	4–16	≤16	32	≥64
Piperasilin/tazobaktam	0.125/4–0.5/4	≤16/4	32/4–64/4	≥128/4
İmipenem	0.03–0.125	≤4	8	≥16
Meropenem	0.03–0.25	≤4	8	≥16
Klindamisin	0.5–2	≤2	4	≥8
Metronidazol	0.25–1	≤8	16	≥32
Tigesiklin	0.125–1	≤4	8	≥16
Linezolid	2–8	-	-	-

3.2.5. Beta laktamaz Aktivitesinin Tespit Edilmesi

Bakterilerin β-laktamaz aktivitesi nitrosefin diski (BD, ABD) ile belirlenmiştir. Nitrosefin diskine bir damla steril distile su damlatıldıktan sonra, test edilecek saf bakteri kültüründen tahta çubukla alınan örnek disk yüzeyine sürülmüştür. Otuz dakika içinde pembe–kırmızı renk oluşması pozitif, renk değişikliği olmaması negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (114).

3.2.6. İmipenemaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Test edilecek bakteri 8 mL beyin kalp infüzyon buyyon (BHIS; 0.5% maya ekstraktı, 5 mg/L hemin ve 1 mg/L vitamin K1) içinde süspanse edilerek bir gece anaerop ortamda inkübe edilmiştir (128). Ertesi gün BHIS kültürü 4 °C'de, 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak 3 mL soğuk fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS) eklenmiş ve 4 °C'de, 8000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. PBS ile yıkama işlemi üç kez tekrarlanmış ve ardından sonikasyon yapılmıştır. Sonikasyonu takiben 4°C, 8000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Elde edilen hücre ekstraktları imipenemaz aktivitesi tayini için kullanılmıştır. Protein konsantrasyonları Qubit Protein Assay Kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. İmipenemin lineer bozunmasını ölçmek için şeffaf plastik küvetlerde 0.1 mM imipenem konsantrasyonu içeren 1 mL reaksiyon tamponu (50 mM HEPES, 25 M ZnSO₄, pH 7) kullanılmıştır. Tampon içinde uygun hücre ekstraktı miktarı ayarlanarak 299 nm'de 0., 2., 5., 10., 15., 20. ve 30. dakikalarda ölçüm yapılmış ve absorbans değişiklikleri kaydedilmiştir. İmipenemaz aktivitesi 1 dakikada hidrolize olan 1 nmol imipenem (U) ile ifade edilmiş ve sonikasyon sonrası ekstraktların protein konsantrasyonuna göre standardize (U/mg) edilmiştir (158).

3.3. Moleküler Yöntemler

3.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Bakteri DNA'larının izolasyonu için daha önce tanımlanan kaynatma yöntemi kullanılmıştır (8). Anaerop agar yüzeyinden bakteri kolonileri alınarak 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerinde, 100 µl steril distile suda süspanse edilmiş ve ardından ısı bloğuna konarak 100 °C'de 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüjlenmiş süspansiyonların süpernatantları steril bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak -20 °C'de saklanmış ve PZR deneylerinde kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

3.3.2. PZR ile Enterotoksin ve Antibiyotik Direnç Genlerinin Saptanması

Gerçek zamanlı PZR'de genlerin amplifikasyonu için daha önce tanımlanmış primerler kullanılmıştır (8, 159-162). PZR karışımı Tablo 3.3.'e göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. Gerçek zamanlı PZR için hazırlanan karışımın içeriği

İçerik	Hacim
Master miks [5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (NO ROX)] (Solis BioDyne, Estonya)	4 µl
Forward primer (10 µM)	0.5 µl
Reverse primer (10 µM)	0.5 µl
Steril DNaz ve RNaz içermeyen su	13 µl
Kalıp DNA	2 µl
Toplam hacim	20 µl

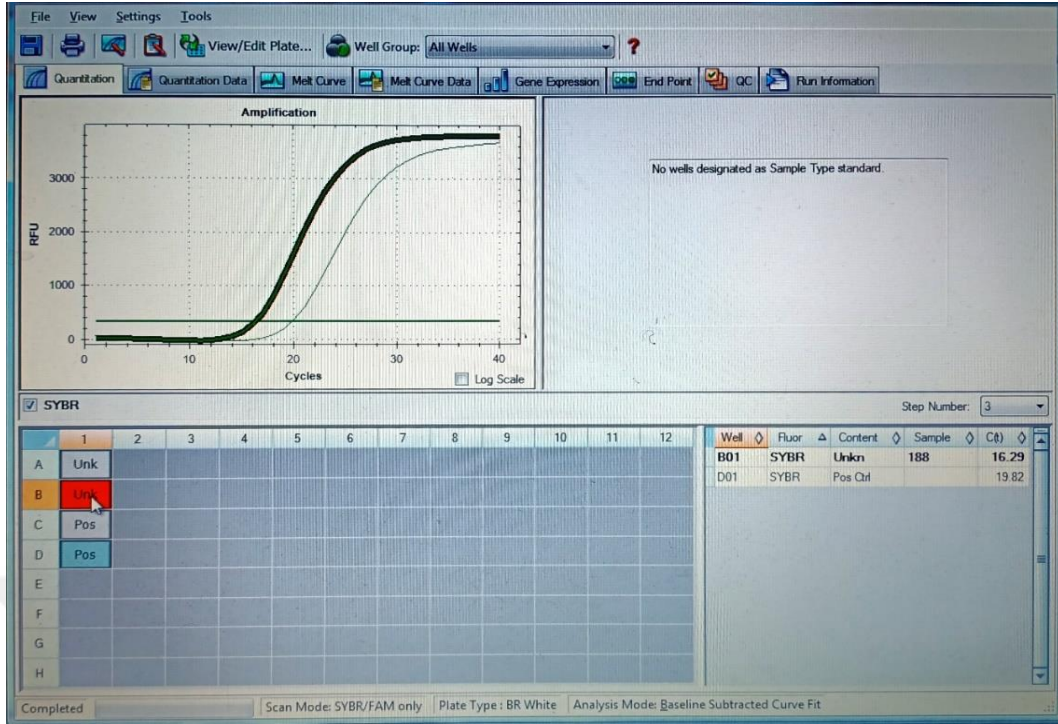
PZR işlemi gerçek zamanlı PZR cihazında (Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, ABD) gerçekleştirilmiştir. Tüm izolatlarda antibiyotik direnç genleri (*cepA*, *cfxA*, *cfiA*, *ermF*, *ermB*, *ermG*, *lnuA*, *mefA*, *msrSA*, *nim*, *tetQ*, *tetX*, *tetX1*) ve enterotoksin geni (*bft*) varlığı araştırılmıştır. Kullanılan primerler ve reaksiyon koşulları Tablo 3.4.'te gösterilmiştir. Çoğaltılan DNA'nın hedef bölge olduğunu kesinleştirmek amacıyla erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. PZR protokolü tamamlandıktan sonra örneğin sıcaklığı 65 °C'den 95 °C'ye yavaş yavaş artırılarak floresan sinyalin sıcaklığa bağlı değişimini gösteren bir grafik oluşturulmuştur. Floresan sinyalin ani düşüşü ile oluşan pikler aracılığıyla, DNA iplikçiklerinin birbirlerinden ayrılmalari gözlemlenmiş ve çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığı belirlenmiştir. Gerçek zamanlı PZR ve erime eğrisi analizi grafiklerinin örnekleri Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.'te sunulmuştur.

IS yalnızca *cfiA* geni taşıyan izolatlarda araştırılmıştır. *CfiA* geni taşıyan izolatlarda, genin upstream bölgesinde IS olup olmadığını tespit etmek için upstream PZR yapılmıştır. *CfiA*-upstream PZR için 94 °C'de 5 dk ön denatürasyon, 72 °C'de 10 dk final ekstansiyon uygulanmıştır. Diğer genlerin amplifikasyonunda 95 °C'de 12 dk ön denatürasyon yapılmıştır. PZR ile enterotoksin ve antibiyotik direnç genlerinin saptanmasında pozitif kontrol olarak *B. fragilis* 638R (*cepA*)(8), *B. fragilis* O:21 (*cfiA*, *nimB*, *ermF*, *tetQ*, *tetX*)(75), *B. vulgatus* CLA341 (*cfxA*, *tetQ*)(159), *C. difficile* 630 (*ermB*, *tetM*)(8), *B. fragilis* BM13 (*tetX*, *tetX1*)(8), *B. fragilis* 83915 (*cepA*, *tetQ*, *ermG*, *mefA*, *msrSA*, *linA*)(8), *B. fragilis* 20985 (*bft*)(163); negatif kontrol olarak DNA

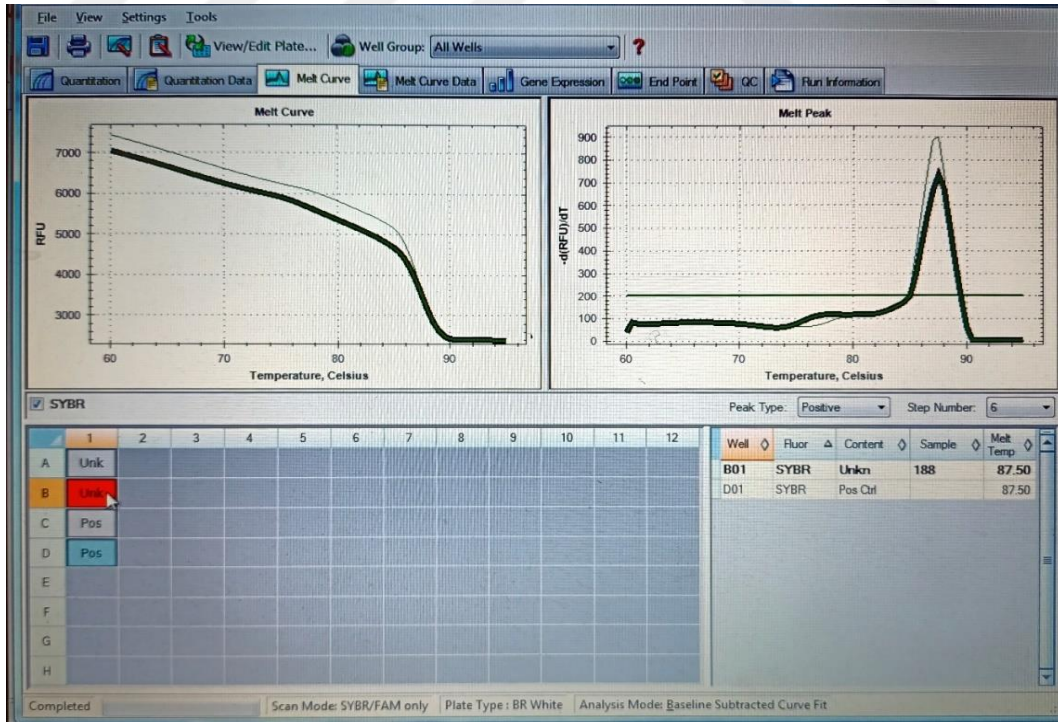
eklenmemiş reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Pozitif kontrol ve negatif kontrol her çalışmaya dahil edilmiştir.

Tablo 3.4. Gerçek zamanlı PZR analizi ile direnç genlerinin tespiti için kullanılan oligonükleotid primerleri ve parametreleri

Gen	Primer (5'→3')	PZR Protokolü	Kaynak
<i>cfxA</i>	F: TGAAGTGGCCCTGAATAATCT R: AAAAAAGATAGCGCAAATCC	95°C 15 sn, 55°C 20 sn, 72°C 20 sn, 35x	(8)
<i>cepA</i>	F: TTTCTGCTATGTCTGCCT R: ATCTTTCACGAAGACGGC	95 °C 15 sn, 56°C 30 sn, 72°C 1 dk, 35x	(8)
<i>cfiA</i>	F: AATCGAAGGATGGGGTATGG R: CGGTCAGTGAATCGGTGAAT	94°C 15 sn, 58°C 20 sn, 72°C 20 sn, 40x	(8)
<i>nim</i>	F: ATGTTTCAGAGAAATGCGGCGTAAGCG R: GCTTCCTTGCCTGTCATGTGCTC	94°C 30 s, 62°C 1 dk, 72°C 1 dk, 35x	(161)
<i>tetQ</i>	F: ATCGGTATCAATGAGTTGTT R: GACTGATTCTGGAGGAAGTA	95°C 15 sn, 50°C 1 dk, 72°C 30 sn, 35x	(8)
<i>tetX</i>	F: TTAGCCTTACCAATGGGTGT R: CAAATCTGCTGTTTCATTCTG	95°C 15 sn, 55°C 20 sn, 72°C 20 sn, 35x	(8)
<i>tetX1</i>	F: TCAGGACAAGAAGCAATGAA R: TATTTTCGGGGTTGTCAAAC	95°C 15 sn, 50°C 1 dk, 72°C 30 sn, 32x	(8)
<i>ermF</i>	F: TAGATATTGGGGCAGGCAAG R: GGAAATTGCGGAAGTCAAAA	95°C 15 sn, 58°C 20 sn, 72°C 20 sn, 35x	(8)
<i>ermB</i>	F: GCGGAATGCTTTCATCCTAA R: GCGTGTTTCATTGCTTGATG	95°C 15 sn, 59°C 20 sn, 72°C 20 sn, 35x	(8)
<i>ermG</i>	F: ATAGGTGCAGGGAAAGGTCA R: TGGATTGTGGCTAGGAAATGT	95°C 15 sn, 59°C 20 sn, 72°C 20 sn, 35x	(8)
<i>linA</i>	F: CTGGGGAGTGGATGTCTTGT R: AGTTGGCTTGTGTTGGAAGTG	95°C 15 sn, 60°C 30 sn, 72°C 30 sn, 35x	(8)
<i>mefA</i>	F: ATACCCCAGCACTCAATTCG R: CAATCACAGCACCAATACG	95°C 15 sn, 51°C 1 dk, 72°C 30 sn, 35x	(8)
<i>msrSA</i>	F: GGGAAGTGAAGATGGCAAA R: TACGAGCCTGTTTTCGCTTT	95°C 15 sn, 60°C 20 sn, 72°C 20 sn, 35x	(8)
<i>bft</i>	F: CGAACTCGGTTTATGCAGTT R: GGATACATCAGCTGGGTTGT	95°C 15 sn, 56°C 20 sn, 72°C 20 sn, 35x	(160)
<i>cfiA-Upstream</i>	F (G): CGCCAAGCTTTGCCTGCCATTA R(Up2):TACGCTTTTCTGTGCCATAACTGC	94°C 30 sn, 52°C 1 dk, 72°C 3 dk, 35x	(162)



Şekil 3.3. Gerçek zamanlı PZR’de *cfIA* geni için elde edilen amplifikasyon eğrileri: kalın çizgi, M188 numaralı *B. fragilis* izolatu; ince çizgi, pozitif kontrol izolatu.



Şekil 3.4. Erime eğrisi analizi: kalın kalın çizgi, M188 numaralı *B. fragilis* izolatu; ince çizgi, pozitif kontrol izolatu.

3.3.3. DNA Dizi Analizi

Nim geni saptanan M29 numaralı *B. fragilis* izolatında *nim* geninin alt tipini, IS saptanan izolatlarda ise IS tipini belirlemek için, DNA dizi analizi yapılmıştır. PZR ürünleri, Roche High Pure PCR Product Purification kiti (Roche, İsviçre) kullanılıp, kitin prosedürlerine uyarak saflaştırılmıştır. Sanger Dizileme örnekleri için ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, ABD) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster, ABD). Elde edilen diziler Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) adresindeki veriler kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.3.4. Rastgele Başlatılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR)]

QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit'i (QIAGEN GmbH, Almanya) kullanılarak kit talimatlarına uygun şekilde DNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra UV spektrofotometre ile ölçülen DNA süspansiyonları 50 ng/μL olacak şekilde sulandırılmıştır.

AP-PCR yöntemi için daha önce standardize edilmiş M13 primerinin kullanıldığı protokol uygulanmıştır (164). Öncelikle 2x amplifikasyon karışımı Tablo 3.5.'te gösterildiği şekilde hazırlanmıştır. Ardından her bir izolat için 25 μL 2x amplifikasyon karışımına; M13 primeri (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'), Taq DNA polimeraz, ddH₂O ve DNA Tablo 3.6.'da belirtildiği şekilde eklenerek 50 μL PZR karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan PZR karışımı ile termal döngü cihazında Tablo 3.7.'de belirtilen ısı döngüsü kullanılarak M13 primerine özgü DNA bölgeleri amplifiye edilmiştir.

Tablo 3.5. 2x amplifikasyon karışımının hazırlanması (164)

10 x Amplifikasyon tamponu	5 μl
dNTP karışımı	1 μl
MgCl ₂ (50 mM)	4 μl
Steril DNaz ve RNaz içermeyen su	15 μl
Toplam hacim	25 μl

Tablo 3.6. 50 µl olan amplifikasyon karışımının hazırlanması (164)

2 x Amplifikasyon karışımı	25 µl
Primer M13 (100 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.5 µl
Steril Dnaz ve Rnaz içermeyen su	21.5 µl
Ekstraksiyon ürünü DNA (50 ng/µl)	2 µl
Toplam hacim	50 µl

Tablo 3.7. AP-PCR için kullanılan ısı döngü profili (164)

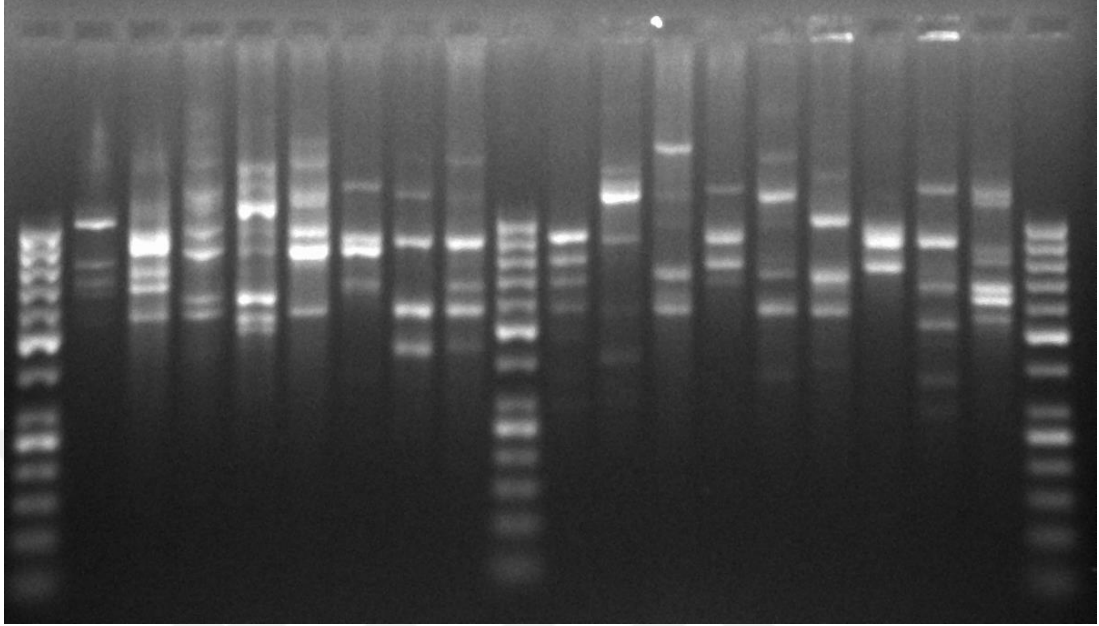
	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	94°C	5 dk	2 siklus
Primer bağlanması	40°C	5 dk	
Primer uzaması	72°C	5 dk	
Denatürasyon	94°C	1 dk	40 siklus
Primer bağlanması	40°C	1 dk	
Primer uzaması	72°C	2 dk	

Amplifikasyon sonrasında 12 µl amplifikasyon ürününe $\frac{3}{4}$ oranında bromfenol mavisi eklendikten sonra %2 agaroz jel içinde 1x TBE buffer (0.089 M Tris, 0.089 M borate, 2 mM EDTA, pH 8.2-8.4) ile 250 dk 120 V'ta elektroforeze tabi tutulmuştur. Gel Logic 2200 görüntüleme sistemi (Kodak Co., Rochester, NY, ABD) ile fotoğrafları çekilerek izolatların bant profilleri karşılaştırılmıştır (Şekil 3.5.). Bant profilleri GelCompar II yazılım sistemi (version 6.5; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak analiz edilmiştir. Bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Dice Korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de *unweighted pair group method with arithmetic mean* (matematiksel ortalamayla ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması, UPGMA) yöntemi kullanılmıştır.

3.4. İstatistiksel Analiz

Farklı izolat gruplarında farklı genlerin veya antibiyotik direnci prevalansı karşılaştırmaları, IBM SPSS Statistics, version 26.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA)

ile ki-kare veya Fischer's exact test kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık eşik düzeyi (p değeri) < 0.05 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.5. BFG izolatlarının örnek AP-PCR jel görüntüsü; soldan sağa sırasıyla DNA Ladder 100 bp, M177, M178, M179, M180, M181, M182, M183, M184, DNA Ladder 100 bp, M185, M186, M187, M188, M189, M190, M192, M193, M194, DNA Ladder 100 bp.

4. BULGULAR

4.1. Tanımlama Sonuçları

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesi'ne 01.07.2018–30.06.2022 tarihleri arasında gelen kan (n=61), pü/apse (n=47), doku (n=7), periton sıvısı (n=11) ve plevra sıvısı (n=3) örneklerinden toplam 138 BFG bakteri izole edilmiştir. Bu izolatlar MALDI-TOF MS ile *B. fragilis* (n=71), *B. thetaiotamicron* (n=23), *B. ovatus* (n=15), *B. faecis* (n=9), *B. uniformis* (n=6), *B. salyersiae* (n=1), *P. vulgatus* (n=9) ve *P. distans* (n=4) olarak tanımlanmıştır. Bazı kan (n=4), doku (n=2), periton sıvısı (n=2) ve pü (n=1) örneklerinde iki farklı türde BFG izolatı üremiştir. Örneklerin 64 tanesinde monomikrobiyal üreme saptanmıştır. Polimikrobiyal üreme saptanan örneklerin 28'inde iki, 19'unda üç, 13'ünde dört, dördünde beş, ikisinde altı mikroorganizma üremesi olduğu belirlenmiştir. Klinik izolatların, bakteri türü ve örnek türüne göre dağılımları Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. BFG izolatların elde edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı

BFG (İzolat Sayısı)	Kan	Plevra Sıvısı	Periton Sıvısı	Doku	Pü/Apse
<i>B. fragilis</i> (n=71)	40	-	6	2	23
<i>B. thetaiotamicron</i> (n=23)	10	1	1	2	9
<i>B. ovatus</i> (n=15)	4	2	1	1	7
<i>B. faecis</i> (n=9)	4	-	2	-	3
<i>B. uniformis</i> (n=6)	1	-	-	3	2
<i>B. salyersiae</i> (n=1)	1	-	-	-	-
<i>P. vulgatus</i> (n=9)	3	-	3	-	3
<i>P. distans</i> (n=4)	2	-	-	1	1
Toplam (n=138)	65	3	13	9	48

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

BFG izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları Tablo 4.2.'de verilmiştir. *B. fragilis* izolatlarının ampicilin, sefoksitin, piperasilin/tazobaktam, imipenem, meropenem, klindamisin, metronidazol ve tigesikline karşı duyarlılık oranları sırasıyla %0, %67.6, %83.1, %85.9, %84.5, %60.6, %98.6 ve %87.3 olarak saptanmıştır. *B. fragilis* dışındaki diğer BFG izolatlarında bu oranlar sırasıyla %3.0, %29.8, %64.2, %100, %100, %37.3, %100 ve %91.0 olarak saptanmıştır. Tüm *Bacteroides* spp.'de

bu antibiyotiklere duyarlılık oranları sırasıyla %1.4, %49.3, %73.9, %92.0, %92.7, %49.3, %99.3 ve %89.1; direnç oranları ise %97.8, %28.3, %11.6, %7.9, %5.1, %47.8, %0 ve %4.3'tür.

Tablo 4.2. BFG izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları

Bakteri Türü	Antibiyotik	MİK Aralığı (µg/ml)	MİK ₅₀	MİK ₉₀	% S	% I	%R
<i>B. fragilis</i> (n=71)	Ampisilin	1→256	32	>256	0	1.4	98.6
	Sefoksitin	2→256	16	64	67.6	16.9	15.5
	Piperasilin/tazobaktam	0.125→>256	1	128	83.1	2.8	14.1
	İmipenem	0.06→128	0.25	8	85.9	4.2	9.9
	Meropenem	0.06→>128	0.25	32	84.5	0	15.5
	Klindamisin	≤0.25→>32	1	>32	60.6	2.8	36.6
	Metronidazol	≤0.125→16	0.5	2	98.6	1.4	0
	Tigesiklin	≤0.125→32	1	8	87.3	7.1	5.6
	Linezolid	1→32	4	4	-	-	-
Diğer BFG İzolatları (n=67)	Ampisilin	0.25→>256	>256	>256	3.0	0	97.0
	Sefoksitin	2→128	32	64	29.8	28.4	41.8
	Piperasilin/tazobaktam	1→>256	16	64	64.2	26.9	8.9
	İmipenem	0.06→2	0.5	2	100	0	0
	Meropenem	0.06→4	0.5	1	100	0	0
	Klindamisin	≤0.25→>32	>32	>32	37.3	3.0	59.7
	Metronidazol	≤0.125→2	0.5	2	100	0	0
	Tigesiklin	≤0.125→>32	1	4	91.0	6.0	3.0
	Linezolid	1→32	4	4	-	-	-
Kısaltmalar: MİK, Minimal inhibitör konsantrasyon; S, duyarlı; I, orta duyarlı; R, dirençli.							

Linezolid için CLSI, EUCAST ve FDA'da sınır değeri bulunmadığından MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri tespit edilmiştir. MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri *B.*

fragilis ve non-*fragilis* BFG’de 4 µg/mL olarak saptanmıştır. Sefoksitin, piperasilin/tazobaktam ve klindamisin duyarlılığı diğer BFG türlerinde *B. fragilis*’e göre daha düşük bulunmuştur. *B. fragilis*’te yedi izolat meropenem ve imipeneme dirençli iken; meropeneme dirençli dört izolatın ikisi imipeneme orta duyarlı, ikisi ise duyarlı saptanmıştır. İmipeneme orta duyarlı (MİK: 8 µg/mL) olan bir izolat ise meropeneme duyarlı (MİK: 0.5 µg/mL) bulunmuştur. Diğer BFG türlerinde karbapenem direnci tespit edilmemiştir. Metronidazol direnci, test edilen 137 BFG izolatında saptanmamış, sadece bir *B. fragilis* izolatı metronidazole orta duyarlı bulunmuştur. *B. fragilis* izolatlarında 65 (%91.5), diğer BFG izolatlarında 57 (%85.1) izolatta β-laktamaz testinde pozitif sonuç alınmıştır. *B. fragilis*’te 10 izolat (%14.1) ÇİD saptanmıştır. Diğer BFG izolatlarında iki *B. faecis*, iki *B. ovatus* ve bir *B. thetaiotamicron* olmak üzere toplam beş izolat (%7.5) ÇİD tespit edilmiştir. Tüm türler birlikte değerlendirildiğinde ÇİD oranı %10.9 bulunmuştur.

4.3. BFG’de Enterotoksin ve Direnç Genlerinin Prevalansı

BFG izolatlarında direnç genlerinin antibiyotik duyarlılık durumlarına göre dağılımı Tablo 4.3.’te gösterilmiştir. Tüm izolatlar içinde *cepA*, *cfxA*, *cfiA*, *ermF*, *ermG*, *ermB*, *nim*, *linA*, *mefA*, *msrSA*, *tetQ*, *tetX*, *tetX1* ve *bft* geni taşıyan izolat sayısı sırasıyla 59 (%42.8), 62 (%44.9), 12 (%8.7), 61 (%44.2), 15 (%10.9), 3 (%2.2), 1 (%0.7), 40 (%29), 24 (%17.4), 10 (%7.2), 105 (%76.1), 11 (%8), 52 (%37.7) ve 23’tür (%16.7). *B. fragilis* ve diğer BFG türleri karşılaştırıldığında; *B. fragilis*’te *cepA* ($p<0.001$), *cfiA* ($p<0.001$) ve *tetX1* ($p<0.001$) genlerinin; diğer BFG türlerinde *cfxA* ($p=0.002$), *ermF* ($p=0.011$), *linA* ($p=0.036$) ve *mefA* ($p=0.016$) genlerinin prevalansı daha yüksek bulunmuştur. *B. fragilis*’te ve diğer BFG’de sefoksitine azalmış duyarlılık ile *cfxA* geni varlığı arasında ve tigesikline azalmış duyarlılık ile *tetQ*, *tetX*, *tetX1* genleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$). Piperasilin/tazobaktama duyarlılığı azalmış *B. fragilis* izolatlarında *cepA* geni ($p<0.001$), duyarlı olmayan izolatlarda *cfiA* geni ($p<0.001$) daha yüksek oranda saptanmıştır. Diğer BFG türlerinde piperasilin/tazobaktama duyarlılığı azalmış izolatlarda *cfxA* geni, duyarlı izolatlarla oranla daha yüksek bulunmuştur ($p=0.011$). Meropenem direnci olan 11 izolatın sekizinde (%72.7) ve duyarlı olan dört (%6.7) izolatta *cfiA* geni tespit edilmiştir ($p<0.001$). İmipeneme azalmış duyarlılık saptanan 10 izolatın yedisinde ve duyarlı izolatların beşinde *cfiA* geni saptanmıştır ($p<0.001$). *B. fragilis*’te tüm izolatlarda

(n=71) *cfiA*-pozitiflik oranı %16.9 bulunmuştur. Metronidazole azalmış duyarlılık gösteren bir izolatta *nim* geni saptanmıştır. *Nim* geni Sanger sekanslama ile dizilenmiş, BLAST veritabanı ile karşılaştırılmış ve *nimE* (MH341532.1) ile %100 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir .

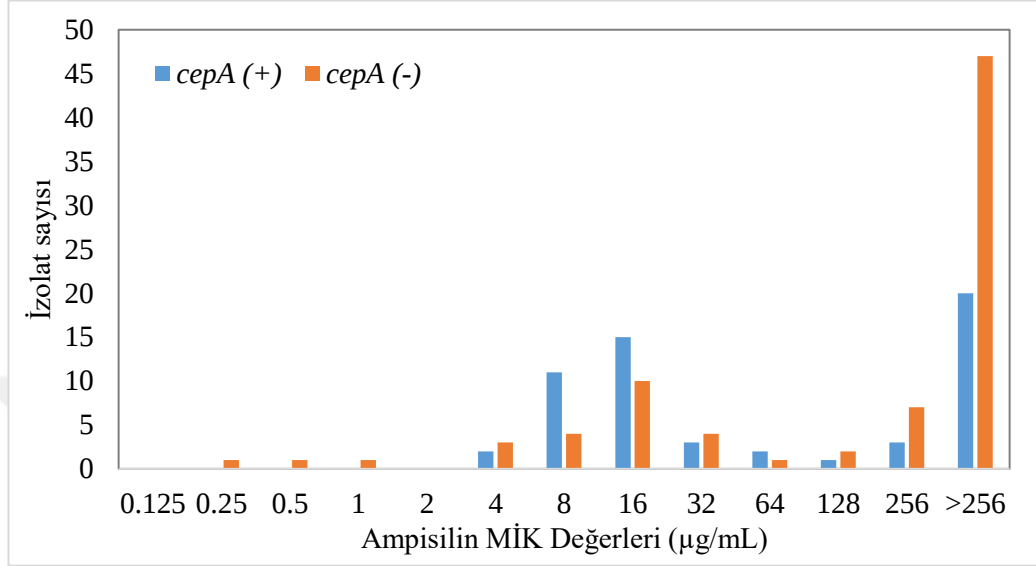
Tablo 4.3. BFG izolatlarında antibiyotik direnç genlerinin dağılımı

Klindamisine azalmış duyarlılık saptanan *B. fragilis* izolatlarında, *ermF* ($p<0.001$), *ermG* ($p=0.032$) ve *mefA* ($p=0.013$) genleri anlamlı şekilde yüksek

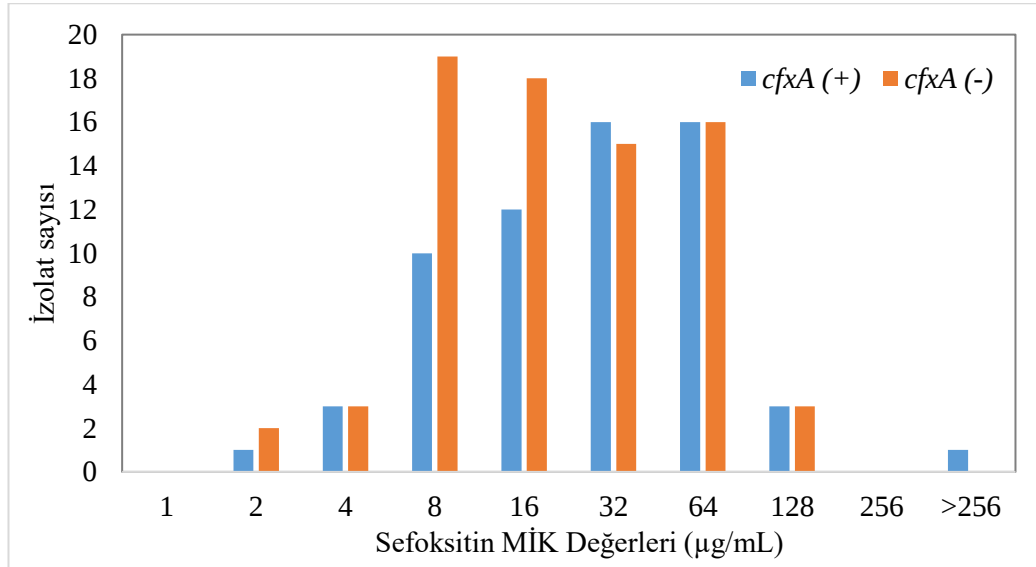
Antibiyotik	Direnç Geni	B. fragilis (n=71)		Diğer BFG Türleri (n=67)	
		İzolat Sayısı (%)			
		Direnç Geni (+), Duyarlı	Direnç Geni (+), Duyarlı Olmayan	Direnç Geni (+), Duyarlı	Direnç Geni (+), Duyarlı Olmayan
Ampisilin	cepA	0 (0)	59 (83.1)	0 (0)	0 (0)
Sefoksitin	cfxA	15 (31.2)	8 (34.8)	11 (55.0)	28 (59.6)
Piperasilin/ tazobaktam	cepA	53 (89.8)	4 (25)	0 (0)	0 (0)
	cfxA	18 (30.5)	5 (41.7)	20 (46.5)	19 (79.2)
	cfiA	4 (6.8)	8 (75)	0 (0)	0 (0)
İmipenem	cfiA	5 (8.2)	7 (70.0)	0 (0)	-
Meropenem	cfiA	4 (6.7)	8 (72.7)	0 (0)	-
Metronidazol	nim	0 (0)	1 (100)	0 (0)	-
Tigesiklin	tetQ	45 (72.6)	9 (100)	45 (73.8)	6 (100)
	tetX	6 (9.7)	0 (0)	4 (6.6)	1 (16.7)
	tetX1	38 (61.3)	8 (88.9)	5 (8.2)	1 (16.7)
Klindamisin	ermF	3 (6.9)	21 (75)	5 (20)	32 (76.2)
	ermB	0 (0)	1 (3.6)	1 (4)	1 (2.4)
	ermG	1 (2.3)	5 (17.9)	2 (8)	7 (16.7)
	linA	12 (27.9)	3 (10.7)	10 (40)	15 (35.7)
	mefA	1 (2.3)	6 (21.4)	2 (8)	15 (35.7)
	msrSA	0 (0)	3 (10.7)	1 (4)	6 (14.3)

saptanmıştır. Diğer BFG türlerinde ise *ermF* ($p<0.001$) ve *mefA* ($p=0.018$) genleri klindamisine azalmış duyarlılık gösteren izolatlarda daha yüksek bulunmuştur. BFG izolatlarında ampisilin, sefoksitin, imipenem, meropenem, piperasilin/tazobaktam, klindamisin, metronidazol ve tigesiklin MİK değerlerine göre ilgili direnç genlerinin dağılımı Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6, Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. *CfiA*-pozitif izolatların meropenem MİK değerleri,

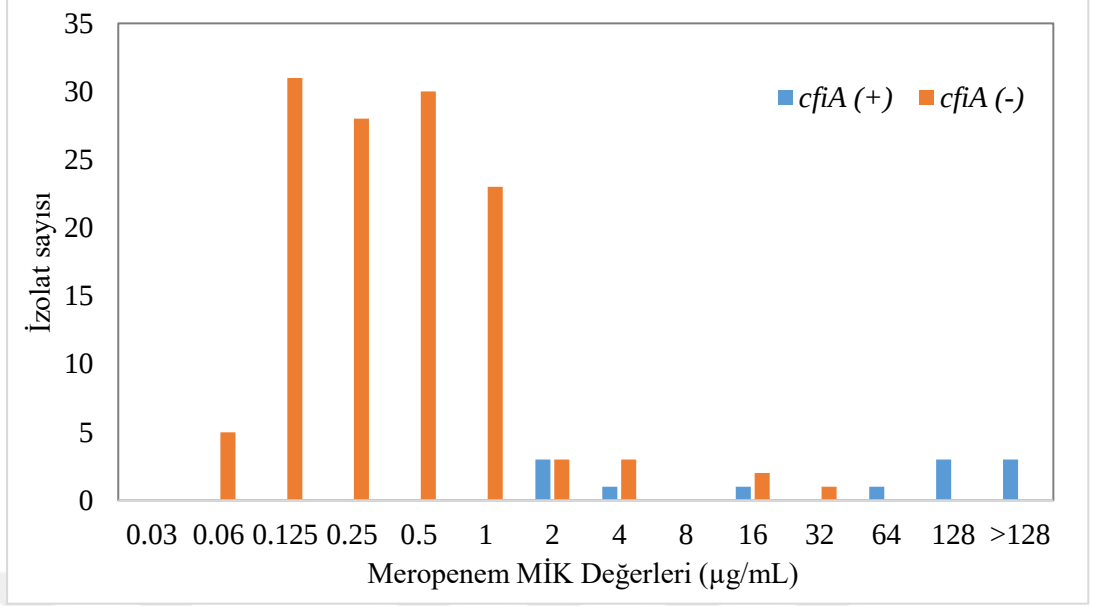
imipeneme göre, daha homojen olarak yüksek bir dağılım göstermiştir. Ampisilin MİK değerleri ile *cepA* varlığı arasında ve sefoksitin MİK değerleri ile *cfxA* varlığı arasında bir korelasyon saptanmamıştır.



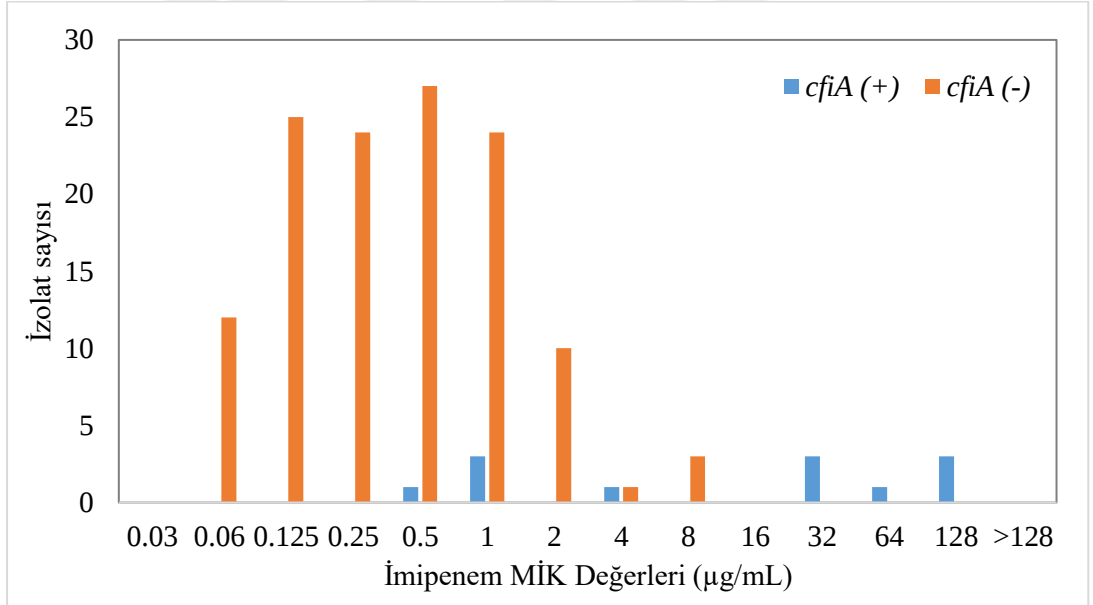
Şekil 4.1. Ampisilin MİK değerlerine göre *cepA*-pozitif ve *cepA*-negatif BFG izolatlarının dağılımı.



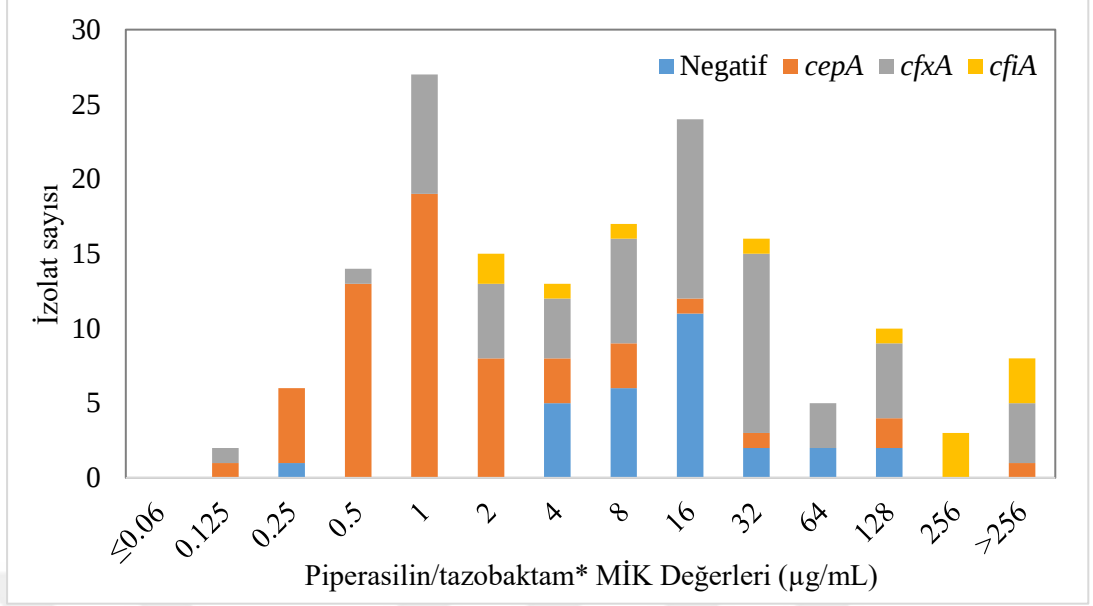
Şekil 4.2. Sefoksitin MİK değerlerine göre *cfxA*-pozitif ve *cfxA*-negatif BFG izolatlarının dağılımı.



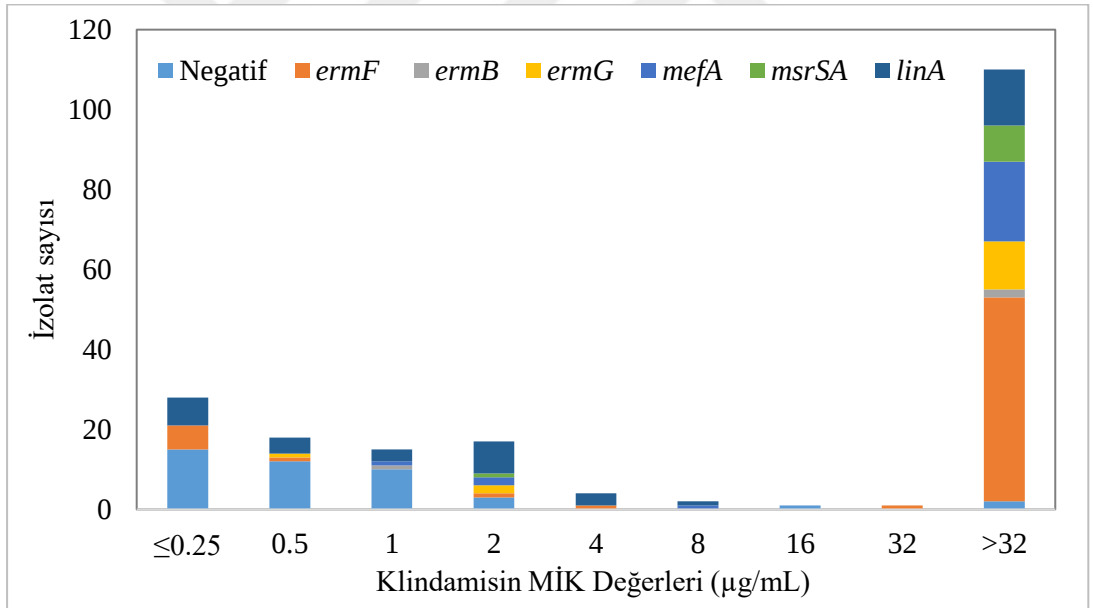
Şekil 4.3. Meropenem MİK değerlerine göre *cfiA*-pozitif ve *cfiA*-negatif BFG izolatlarının dağılımı.



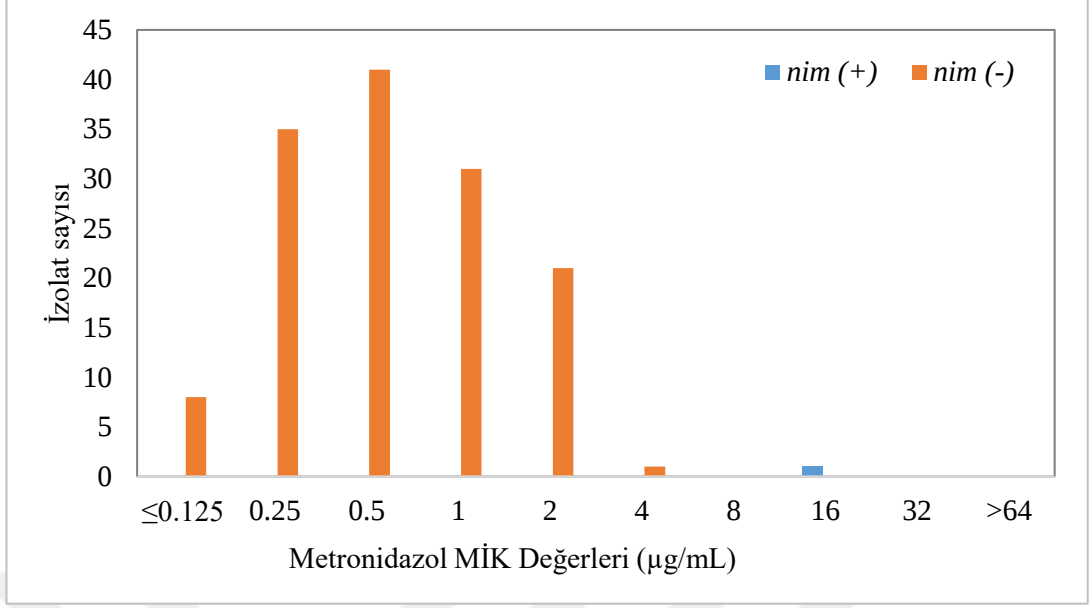
Şekil 4.4. İmipenem MİK değerlerine göre *cfiA*-pozitif ve *cfiA*-negatif BFG izolatlarının dağılımı.



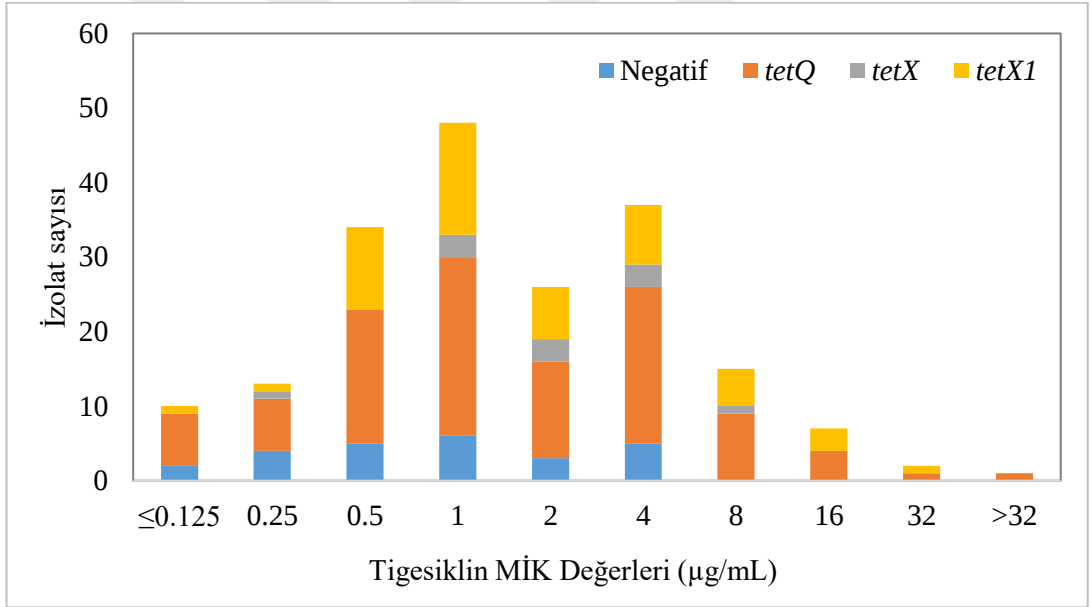
Şekil 4.5. Piperacilin/tazobaktam MİK değerlerine göre *cepA*, *cfxA* ve *cfiA* genlerinin dağılımı. *Tazobaktam konsantrasyonu 4 µg/mL’de sabitlenmiştir.



Şekil 4.6. Klindamisin MİK değerlerine göre *ermF*, *ermB*, *ermG*, *mefA*, *msrSA* ve *linA* genlerinin dağılımı.



Şekil 4.7. Metronidazol MİK değerleri ve *nim* geni dağılımı.



Şekil 4.8. Tigesiklin MİK değerlerine göre *tetQ*, *tetX* ve *tetX1* genlerinin dağılımı.

B. fragilis ve diğer BFG türlerinin kan ve kan dışı klinik örneklerden elde edilen izolatlarında antibiyotik direnci ve direnç genlerinin prevalansının karşılaştırılması Tablo 4.5.'te gösterilmiştir. *B. fragilis* kan izolatlarında sefoksitin ($p=0.0116$), piperasilin/tazobaktam ($p=0.009$), imipenem ($p=0.003$) ve meropenem ($p=0.018$) duyarlı olmama durumu ve *cfiA* geni varlığı ($p<0.001$); kan dışı izolatlarda ise *cepA* ($p=0.002$) ve *tetX1* ($p=0.013$) genlerinin varlığı anlamlı derecede daha yüksek saptanmıştır. Diğer BFG türlerinde kan dışı izolatlarda *ermF* ($p=0.029$) geninin

prevalansı kan izolatlarına göre anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Diğer antibiyotikler ve genler için kan ve kan dışı izolatlar arasında bir fark saptanmamıştır.

Tablo 4.4. Kan ve kan dışı klinik örneklerden izole edilen *B. fragilis* ve diğer BFG türlerinde antibiyotiklere duyarlı olmama durumu ve direnç genlerinin prevalansı.

	İzolat Sayısı (%)			
	<i>B. fragilis</i>		Diğer BFG	
Antibiyotik	Kan (n=40)	Diğer (n=31)	Kan (n=24)	Diğer (n=43)
Ampisilin	40 (100)	31 (100)	24 (100)	41 (95.3)
Sefoksitin	18 (45)	5 (16.1)	18 (75)	29 (67.4)
Piperasilin/tazobaktam	11 (27.5)	1 (3.2)	12 (50)	12 (27.9)
İmipenem	10 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Meropenem	10 (25)	1 (3.2)	0 (0)	0 (0)
Klindamisin	15 (37.5)	13 (41.9)	12 (50)	30 (69.8)
Metronidazol	1 (2.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Tigesiklin	6 (15)	3 (9.7)	2 (8.3)	4 (9.3)
Direnç Genleri				
<i>cepA</i>	27 (67.5)	30 (96.8)	0 (0)	0 (0)
<i>cfxA</i>	11 (27.5)	12 (38.7)	17 (70.8)	22 (51.2)
<i>cfiA</i>	12 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>nim</i>	1 (2.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>tetQ</i>	30 (75)	24 (77.4)	18 (75)	33 (76.7)
<i>tetX</i>	3 (7.5)	3 (9.7)	2 (8.3)	3 (7)
<i>tetX1</i>	21 (52.5)	25 (80.6)	2 (8.3)	4 (9.3)
<i>ermF</i>	13 (32.5)	11 (35.5)	9 (37.5)	28 (65.1)
<i>ermB</i>	1 (2.5)	0 (0)	0 (0)	2 (4.6)
<i>ermG</i>	3 (7.5)	3 (9.7)	6 (25)	3 (7)
<i>linA</i>	10 (25)	5 (16.1)	6 (25)	19 (44.2)
<i>mefA</i>	4 (10)	3 (9.7)	9 (37.5)	8 (18.6)
<i>msrSA</i>	2 (5)	1 (3.2)	4 (16.7)	3 (7)

B. fragilis'te 23 izolatın enterotoksin geni (*bft*) içerdiği saptanmıştır. *Bft* pozitif ve *bft* negatif izolatlarda antibiyotik direnci ve direnç genlerinin prevalansının karşılaştırılması Tablo 4.4.'te verilmiştir. *Bft* negatif izolatlarda sefoksitin ($p=0.003$), piperasilin/tazobaktam ($p= 0.006$), imipenem ($p=0.024$), meropeneme azalmış duyarlılık ($p=0.012$) ve *cfiA* ($p= 0.006$) geni; *bft* pozitif izolatlarda ise *cepA* ($p=0.003$)

ve *msrSA* ($p=0.031$) genleri istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Diğer antibiyotikler ve genler için istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Tablo 4.5. *B. fragilis*'te *bft*-pozitif ve *bft*-negatif izolatlarda antibiyotik direnci ve direnç genlerinin prevalansı.

	Duyarlı Olmayan İzolat Sayısı (%)	
Antibiyotik	<i>bft</i> (+) (n=23)	<i>bft</i> (-) (n=48)
Ampisilin	23 (100)	48 (100)
Sefoksitin	2 (8.7)	21 (43.7)
Piperasilin/tazobaktam	0 (0)	12 (48)
İmipenem	0 (0)	10 (20.8)
Meropenem	0 (0)	11 (22.9)
Klindamisin	7 (30.4)	21 (43.7)
Metronidazol	0 (0)	1 (2.1)
Tigesiklin	3 (13.0)	6 (12.5)
Direnç Genleri		
<i>cepA</i>	23 (100)	34 (70.8)
<i>cfxA</i>	5 (21.7)	18 (37.5)
<i>cfiA</i>	0 (0)	12 (25)
<i>nim</i>	0 (0)	1 (2.1)
<i>tetQ</i>	17 (73.9)	37 (77.1)
<i>tetX</i>	1 (4.3)	5 (10.4)
<i>tetX1</i>	13 (56.5)	33 (68.7)
<i>ermF</i>	4 (17.4)	20 (41.7)
<i>ermB</i>	1 (4.3)	0 (0)
<i>ermG</i>	4 (17.4)	2 (4.2)
<i>linA</i>	6 (26.1)	9 (18.7)
<i>mefA</i>	3 (13.0)	4 (8.3)
<i>msrSA</i>	3 (13.0)	0 (0)

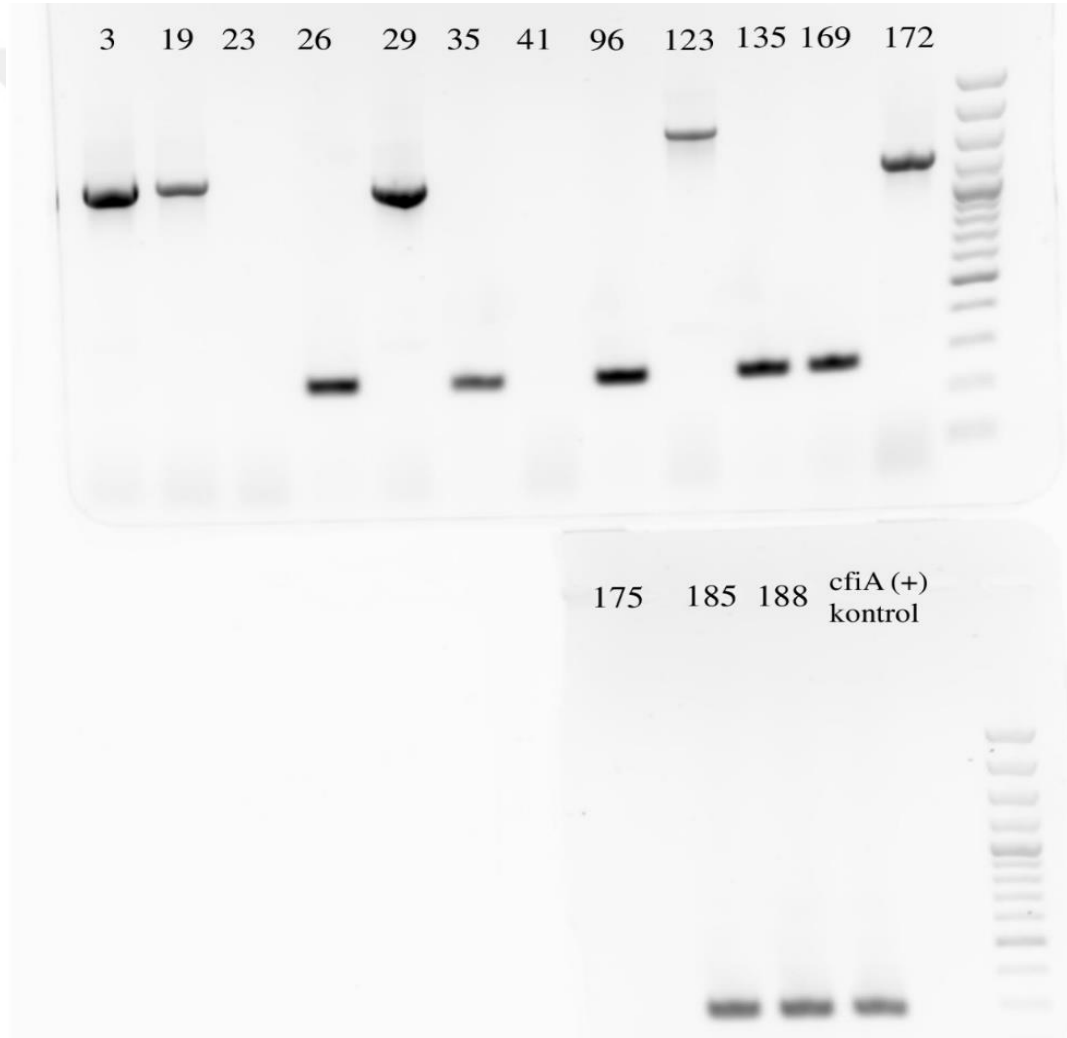
Karbapeneme dirençli veya karbapenem direnç geni (*cfiA*) barındıran izolatların özellikleri Tablo 4.6.'da verilmiştir. İzolatların 14'ü kandan, biri psoas apsesinden alınan püye örneğinden üretilmiştir. İmipenem MİK değerlerinin genellikle meropenem MİK değerlerinden düşük olduğu gözlenmiştir. Karbapeneme dirençli olan üç izolatta *cfiA* geni saptanmamıştır. Dört izolatta ise *cfiA* geni taşımalarına karşın fenotipik direnç tespit edilmemiştir.

Tablo 4.6. Karbapeneme dirençli veya karbapenem direnç geni (*cfiA*) pozitif izolatların (n=15) özellikleri.

No	Klinik Örnek	IMI MİK	MEM MİK	<i>cfiA</i>	Diğer Ab R	Diğer R Gen(ler)i
M3	Kan	128	128	+	FOX, TZP, CM	<i>cfxA</i> , <i>ermF</i> , <i>tetQ</i>
M19	Kan	32	64	+	FOX, TZP, CM	<i>ermF</i> , <i>tetQ</i>
M23	Püy (psoas absesi)	2	16	-	FOX, CM	<i>cepA</i> , <i>cfxA</i> , <i>ermF</i> , <i>tetQ</i> , <i>tetX1</i> , <i>linA</i>
M26	Kan	2	16	+	FOX	<i>mefA</i>
M29	Kan	128	>128	+	FOX, TZP	<i>cfxA</i> , <i>tetQ</i> , <i>nim</i>
M35	Kan	1	2	+	FOX	-
M41	Kan	8	32	-	CM, TGC	<i>cepA</i> , <i>cfxA</i> , <i>ermF</i> , <i>tetQ</i> , <i>tetX1</i>
M96	Kan	64	128	+	FOX, TZP	<i>cfxA</i> , <i>linA</i> , <i>tetQ</i>
M123	Kan	128	128	+	FOX, TZP, CM	<i>mefA</i> , <i>ermF</i> , <i>tetQ</i> , <i>tetX</i>
M135	Kan	1	4	+	CM	-
M169	Kan	32	>128	+	FOX, TZP	-
M172	Kan	32	>128	+	FOX, TZP, CM	<i>ermF</i> , <i>tetQ</i> , <i>tetX</i>
M175	Kan	8	16	-	FOX, TZP	<i>cepA</i> , <i>tetX1</i>
M185	Kan	1	2	+	-	<i>cfxA</i> , <i>tetQ</i>
M188	Kan	0.5	2	+	-	<i>tetQ</i>
Kısaltmalar: IMI, İmipenem; MEM, meropenem; Ab, antibiyotik; R, direnç; FOX, sefoksitin; TZP, piperasilin/tazobaktam; CM, klindamisin; TGC, tigesiklin						

Karbapeneme dirençli veya karbapenem direnç geni (*cfiA*) pozitif toplam 15 izolata upstream PZR yapılmış ve imipenemaz aktivitesi ölçülmüştür. Bu deneylerin sonuçları Tablo 4.7.'de sunulmuştur. Upstream PZR sonrası jel elektroforezinde bant elde edilmemesi izolatın *cfiA* geni taşımadığını, yaklaşık 0.3 kb boyutunda bant görülmesi *cfiA* genini taşıdığını ancak upstream bölgesinde IS olmadığını göstermektedir. *CfiA* geni ve genin upstream bölgesinde IS barındıran izolatlarda >1 kb boyutunda bant olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9) (162). IS saptanan izolatlarda IS

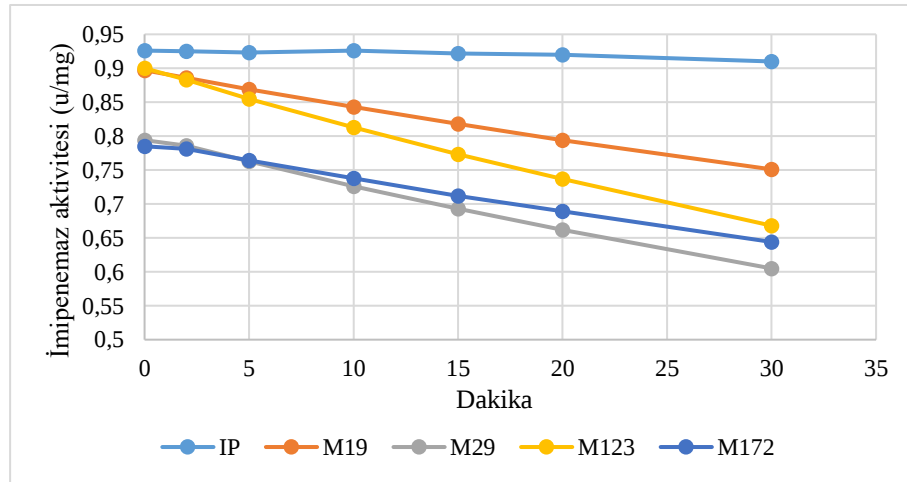
tipini belirlemek için dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi sonuçlarına göre üç izolatta *IS1187*, bir izolatta *ISBf6*, bir izolatta *IS612B* bulunmuştur. Bu izolatlarda imipenemaz ölçümü sırasında elde edilen, imipenemin zamana bağlı bozunmasını gösteren grafikler Şekil 4.10., Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.'da verilmiştir. İzolatların imipenemaz aktivitesinin U/mg cinsinden değerleri Tablo 4.7.'de belirtilmiştir. IS saptanan izolatların yüksek imipenemaz aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. M169 numaralı izolatta yüksek imipenemaz aktivitesi saptanmış, fakat IS tespit edilmemiştir. Kandan izole edilen bu *B. fragilis* izolatının ampisilin, sefoksitin, piperasilin/tazobaktam ve karbapenemlere dirençli olduğu; *cfiA* dışında bir direnç geni taşımadığı saptanmıştır.



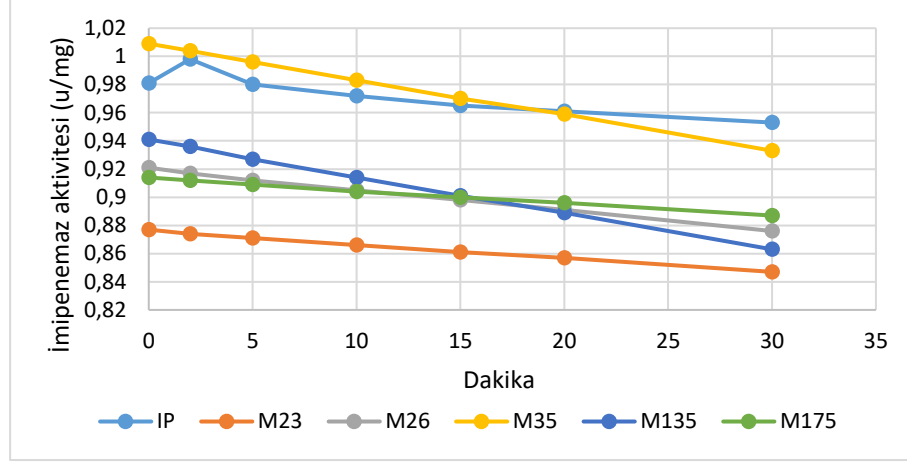
Şekil 4.9. *B. fragilis* izolatlarında upstream PZR sonrası yapılan jel elektroforezi. Her sütun başında test edilen izolat numarası yer almaktadır.

Tablo 4.7. Karbapeneme dirençli veya karbapenem direnç geni (*cfiA*) pozitif izolatların (n=15) upstream PZR ve imipenemaz aktivitesi sonuçları.

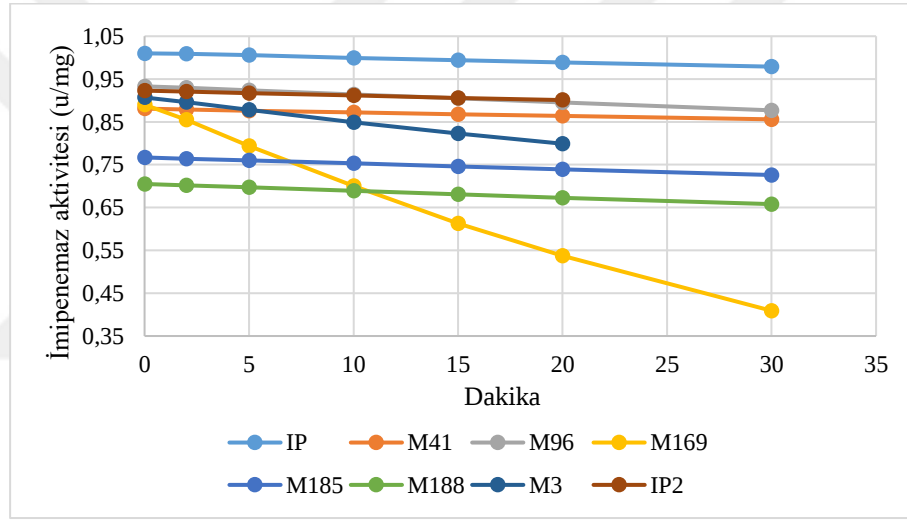
No	IMI MİK	MEM MİK	<i>cfiA</i>	Upstream PZR	İmipenemaz Aktivitesi (u/mg)
M3	128	128	+	<i>IS1187</i>	61,3839
M19	32	64	+	<i>IS1187</i>	109,7633
M23	4	16	-	-	0,5845
M26	4	16	+	0.3 kb	2,6325
M29	128	>128	+	<i>ISBf6</i>	163,7012
M35	1	2	+	0.3 kb	7,1376
M41	8	32	-	-	0
M96	64	128	+	0.3 kb	5,7096
M123	128	128	+	<i>IS612B</i>	151,6339
M135	1	4	+	0.3 kb	6,4667
M169	32	>128	+	0.3 kb	83,3489
M172	32	>128	+	<i>IS1187</i>	85,051
M175	8	16	-	-	0,1527
M185	1	2	+	0.3 kb	2,9047
M188	0.5	2	+	0.3 kb	4,6542



Şekil 4.10. İmipenemaz aktivitesi: M19, M29, M123 ve M172 numaralı *B. fragilis* izolatlarında imipenem konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi.



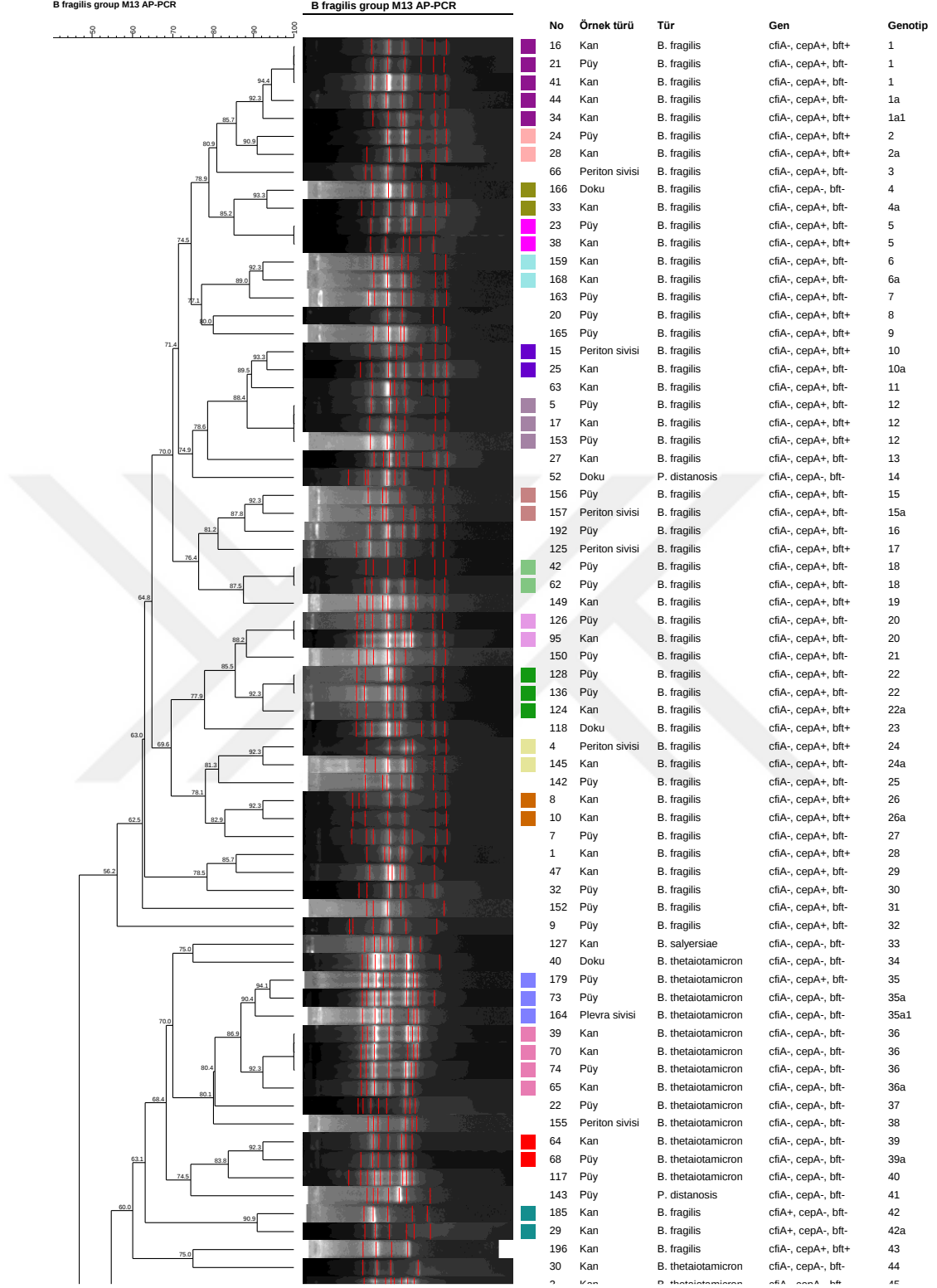
Şekil 4.11. İmipenemaz aktivitesi: M23, M26, M35, M135 ve M175 numaralı *B. fragilis* izolatlarında imipenem konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi



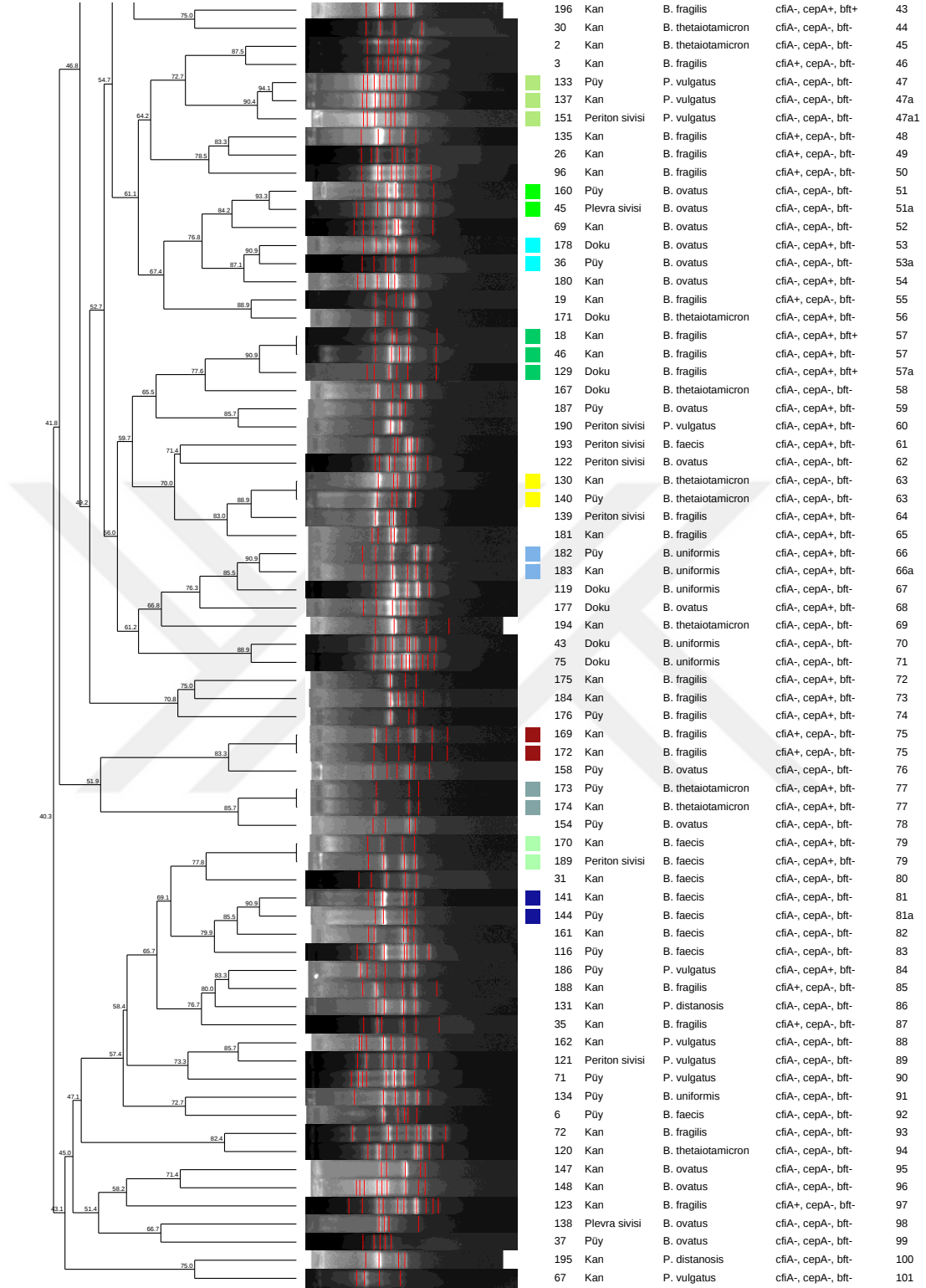
Şekil 4.12. İmipenemaz aktivitesi: M3, M41, M96, M169, M185 ve M188 numaralı *B. fragilis* izolatlarında imipenem konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi

4.4. BFG İzolatlarının AP-PCR ile Genotiplendirilmesi

AP-PCR sonrası oluşan bant profillerinin GelCompar II yazılım sistemi kullanılarak analizi ile oluşturulan dendrogram Şekil 4.13.'de segilenmiştir. Toplam 138 izolat incelenmiş ve 101 farklı genotip saptanmıştır. Farklı BFG türlerinin AP-PCR ile farklı genotiplere ayrıldığı tespit edilmiştir. Kümeleşme gösteren izolatlar 27 farklı küme içinde toplanmıştır (tolerans 1.0, optimizasyon 1.0, eşik değer: %90). BFG izolatlarının 64'ü herhangi bir küme içinde yer almakta olup, kümeleşme oranı %46.3'tür. En büyük küme beş izolatın yer aldığı genotip 1 kümesidir. Çalışmamızda baskın bir salgın izolatına rastlanmamıştır.



Şekil 4.13. BFG izolatlarının AP-PCR analizi ile oluşturulan dendrogramı



Şekil 4.13. (Devam) BFG izolatlarının AP-PCR analizi ile oluşturulan dendrogramı

5. TARTIŞMA

BFG bakteriler insan mikrobiyotasının yaygın üyeleridir. Sağlıklı kişilerde çeşitli maddelerin metabolizmasında aktif rol oynamalarına karşın; intraabdominal enfeksiyonlar, apseler ve kan dolaşımı enfeksiyonları dahil olmak üzere, insan enfeksiyonlarından en yaygın izole edilen anaerob bakterilerdir (165). Kan dolaşımı enfeksiyonları en sık intraabdominal enfeksiyonlara, yumuşak doku enfeksiyonlarına, cerrahi uygulamalara ve onkolojik durumlara sekonder gelişmektedir. Anaerobik bakterilerin neden olduğu bakteriyemi oranı coğrafi konuma, hasta özelliklerine ve zamana göre farklılık göstermektedir (166-168). BFG'ye bağlı bakteriyemi oranları çalışmalarda %20-%71 arasında değişmektedir (1, 166, 168). Bu çalışmada incelenen 138 BFG bakterinin 65'i (%47.1) kan örneklerinden izole edilmiştir. Kan örneklerinden izole edilen BFG türleri içinde *B. fragilis*'in (n=40) oranı %61.5'tir. Tüm örnekler dikkate alındığında en sık izole edilen tür yine *B. fragilis*'tir (n=71, %51.4). Bunun nedeni *B. fragilis*'in doku adezyonu, konak immün yanıtından kaçma, aerotolerans gibi önemli virülans faktörleri barındırmasıdır (17).

Hastalıkla ilişkili diğer birçok anaeroplara karşılaştırıldığında, BFG üyelerinin geniş spektrumlu beta laktamlar ve metronidazol dahil olmak üzere anaerob enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere direnç oranı daha yüksektir (12). Buna bağlı olarak, BFG bakteriler ile gelişen enfeksiyonlar, kötü klinik sonuçlarla ilişkilendirilebilir (169). Geçmişte, bu mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılığı öngörülebilir bir profil göstermiş ve ampirik tedavi güvenle uygulanabilmiştir. Ancak son zamanlarda tüm dünyada anaeroplara etkinlik gösteren birçok önemli antibiyotiğe (β -laktamlar, klindamisin) karşı dirençte istikrarlı ve anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (68, 170). The Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) programı kapsamında Belçika, Çek Cumhuriyeti, Fransa, Almanya, Yunanistan, Macaristan, İtalya, İspanya, İsveç, Birleşik Krallık, Japonya ve ABD'de 2007-2020 yılları arasında izole edilen 4973 klinik *Bacteroides* spp. izolatının dahil edildiği bir çalışmada ADT agar dilüsyon yöntemiyle çalışılmış ve CLSI'a göre değerlendirilmiştir (81). Bu çalışmada *Bacteroides* spp.'de sefoksitin, piperasilin/tazobaktam, meropenem, klindamisin, metronidazol ve tigesiklin duyarlılıkları sırasıyla %82, %95.9, %97.7, %65.1, %99.7 ve %95 oranlarında

bulunmuştur. Benzer metodoloji ile yapılan bizim çalışmamızda bu oranlar %49.3, %73.9, %92.0, %49.3, %99.3 ve %89.1 oranlarında saptanmıştır. ATLAS çalışması ile karşılaştırıldığında, hastanemiz izolatlarında sefoksitin, piperasilin/tazobaktam, meropenem, klindamisin ve tigesiklin duyarlılığının daha düşük olması dikkat çekmektedir. ATLAS çalışmasında *B. fragilis*'e göre, non-fragilis *Bacteroides* spp.'de sefoksitin, klindamisin, piperasilin/tazobaktam ve tigesiklin direnci istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da tigesiklin dışındaki üç antibiyotik için benzer bulgu saptanmıştır. Bu farklılık tigesiklin dirençli izolat sayımızın az olmasından kaynaklanmış olabilir. Bunun yanı sıra çeşitli çalışmalarda non-fragilis *Bacteroides* spp.'de yıllar içinde sefoksitine, klindamisine, β -laktam/ β -laktamaz inhibitörleri ve karbapenemlere duyarlılığın azaldığı gösterilmiştir (5, 81, 171, 172). Avrupa'nın bazı bölgelerinde, %8 ila %74 arasında değişen sefoksitin direnci oranları bildirilmiştir (173). Global olarak, β -laktam/ β -laktamaz inhibitör kombinasyonlarına direnç düşük seyretmeye devam etmektedir ancak bazı coğrafik bölgelerde yüksek direnç oranları bildirilmektedir. Avrupa'daki birçok ülke piperasilin-tazobaktama direnç oranlarını <%10 olarak bildirirken, Çin ve Japonya'daki son araştırmalar amoksisilin-klavulanik asite %34 ve piperasilin-tazobaktama karşı %11 ila %12 oranlarında direnç bildirmektedir (174, 175). Kanada'da yapılan bir çalışmada 2012 yılı ile kıyaslandığında 2019'da piperasilin/tazobaktam duyarlılığının *B. fragilis* dışı BFG üyelerinde %98.1'den %77.8'e, *Parabacteroides* spp.'de %100'den %25'e düştüğü gösterilmiştir (172).

Türkiye'de anaerop bakterilerin antibiyotiklere duyarlılık durumlarını ve direnç mekanizmalarını araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ülger-Toprak ve ark. (176) 1999-2002 yılları arasında izole edilen 45 klinik BFG izolatında agar dilüsyon ile ampisilin, piperasilin, sefoksitin, amoksisilin/klavulanik asit, imipenem, klindamisin, metronidazol ve kloramfenikole karşı sırasıyla %93, %13, %11, %2, %2, %36, %0 ve %2 oranlarında direnç tespit etmişlerdir. Doğan ve ark. (177)'nin 2007 yılına ait izolatlar ile yaptıkları çalışmada gradient test yöntemiyle on BFG izolatının sekizinin penisiline, üçünün klindamisine dirençli olduğu saptanmıştır. Sefoksitin, piperasilin/tazobaktam, imipenem ve metronidazol direnci tespit edilmemiştir. Kangaba ve ark. (178)'nin 2012 ve 2013 yıllarında izole edilen 50 *B. fragilis* izolatı (25 klinik, 25 intestinal örnek) ile yaptıkları çalışmada agar dilüsyon ile ampisilin,

amoksisilin/klavulanik asit, imipenem, sefoksitin, klindamisin, metronidazol ve tetrasiklin antibiyotiklerine direnç oranları %94, %8, %8, %30, %58, %8 ve %84 saptanmıştır. Ayrıca izolatlarda *cepA*, *cfiA*, *ermF*, *nim* ve *tetQ* genleri araştırılmış ve sırası ile %90, %12, %58, %6, %78 oranlarında pozitiflik saptanmıştır (178). Demir ve ark. gradient test ile 2014-2015 yıllarına ait 14 BFG izolatının 13'ünün penisiline, beşinin sefoksitine ve dördünün klindamisine dirençli olduğunu bildirmiştir. Moksifloksasin, imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem ve metronidazol direnci ise saptanmamıştır. Eminoğlu ve ark. (179) agar dilüsyon ile 2017-2018 yıllarına ait 56 BFG izolatının ampisilin, ampisilin/sulbaktam, sefoksitin, imipenem, klindamisin, tigesiklin, moksifloksasin ve metronidazole duyarlılık oranlarını sırası ile %0, %66.1, %68, %98.2, %46.4, %89.3, %57.1, %98.2 olarak saptamıştır. Türkiye'den 2017 yılında izole edilen 75 *Bacteroides* spp.'nin de incelendiği uluslararası çok merkezli bir çalışmada, Türkiye izolatlarında gradient test ile penisilin, piperasilin/tazobaktam, klindamisin ve sefoksitin direnci sırasıyla %90.6, %10.6, %22.6, %46.6 oranlarında bulunmuştur. Amoksisilin/klavulanik asit, metronidazol, imipenem ve meropenem direnci ise saptanmamıştır (173). Dünyadaki farklı çalışmaları karşılaştırmanın temel zorlukları kullanılan antibiyotik duyarlılık test yöntemlerinin farklı olması ve yorumlama için farklı rehberlerin (EUCAST, CLSI) kullanılmasıdır.

Eitel ve ark. (8)'nin yürüttüğü, Türkiye'den 16 BFG izolatının dahil edildiği çok merkezli bir Avrupa çalışmasında, Türkiye izolatlarında *cepA* (%62.5), *cfxA* (%31.3), *cfiA* (%6.3), *ermF* (%56.3), *ermG* (%31.3), *linA* (%25.0), *mefA* (%43.8), *msrSA* (%31.3), *tetQ* (%87.5), *tetX* (%25.0), *tetX1* (%25.0) ve *bexA* (%12.5) genleri saptanmıştır. Araştırılan diğer direnç genleri *nim*, *ermB*, *tetM*, *tet36* ise tespit edilmemiştir. Bu çalışmalarda Belçika, Hırvatistan, Çek Cumhuriyeti, Fransa, Almanya, Yunanistan, Macaristan ve İsveç'ten izolatlar dahil edildiğinde toplamda 161 BFG izolatu incelenmiş, *cepA* (%70.2), *cfxA* (%18), *cfiA* (%7.5), *ermF* (%24.2), *ermB* (%0.6), *ermG* (%5.6), *linA* (%21.7), *mefA* (%12.4), *msrSA* (%5.6), *tetQ* (80.1), *tetX* (%9.9), *tetX1* (%4.3) ve *bexA* (%7.5) genleri tespit edilmiştir. Hiçbir izolatta *nim*, *tetM* ve *tet36* geni saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda ise tüm izolatlar içinde *cepA*, *cfxA*, *cfiA*, *ermF*, *ermG*, *ermB*, *nim*, *linA*, *mefA*, *msrSA*, *tetQ*, *tetX*, *tetX1* ve *bft* geni taşıyan izolat sayısının sırasıyla 59 (%42.8), 62 (%44.9), 12 (%8.7), 61 (%44.2), 15

(%10.9), 3 (%2.2), 1 (%0.7), 40 (%29), 24 (%17.4), 10 (%7.2), 105 (%76.1), 11 (%8), 52 (%37.7) ve 23 (%16.7) olduğu belirlenmiştir. *B. fragilis* ve diğer BFG türleri karşılaştırıldığında; *B. fragilis*'te *cepA* ($p<0.001$), *cfiA* ($p<0.001$) ve *tetX1* ($p<0.001$) genlerinin; diğer BFG türlerinde *cfxA* ($p=0.002$), *ermF* ($p=0.011$), *linA* ($p=0.036$) ve *mefA* ($p=0.016$) genlerinin prevalansı daha yüksek bulunmuştur. Bizim bulgularımıza benzer olarak Eitel ve ark.(8)'nin çalışmasında *cepA* ve *cfiA* geni *B. fragilis*'te, *cfxA* geni diğer BFG'de daha yüksek saptanmıştır. Farklı olarak ise *erm* genleri, *linA* ve *tetX1* için *B. fragilis* ve diğer BFG türleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamış, *mefA* geni ise *B. fragilis*'de daha yüksek oranda saptanmıştır. Ayrıca çalışmamıza benzer şekilde ampisilin MİK değerleri ile *cepA* varlığı arasında, sefoksitin MİK değerleri ile *cfxA* varlığı arasında ve tigesiklin direnci ile *tet* genleri arasında bir korelasyon bulunmamıştır. Bu sonuçlar ampisilin ve sefoksitin direncinde *cepA* ve *cfxA* genlerinin yanı sıra PBP'lerde değişiklik veya efluks pompalarının rolü olabileceğini düşündürmektedir. Soki ve ark.(159)'nın yaptığı bir çalışmada sefoksitin direncinin birden fazla faktöre bağlı olduğu; PBP'lerin majör, *cfxA* ekspresyonun ise minör rol oynadığı belirtilmiştir. BFG izolatlarında piperasilin/tazobaktam direnç mekanizmalarının ortaya konması için daha ileri çalışmalar gereklidir.

Beta-laktam antibiyotikler arasında karbapenemler, anaerobik bakterilere karşı en geniş spektruma sahip antibiyotik grubudur. Literatüre bakıldığında, dünya çapında karbapenem dirençli BFG izolatlarının oranının %0 ila %29.5, *cfiA* genine sahip izolatların oranının da %7,6 ila %38,9 arasında değiştiği görülmektedir (128, 142, 143, 146, 174, 180, 181). Karbapenem direnci, *B. fragilis* izolatlarında *B. fragilis* dışı BFG türlerine göre daha yüksek görülmektedir. Karbapenem direnç oranlarındaki farklılıklar coğrafi bölge, antibiyotik tüketim oranlarının yanı sıra; örnek türü, test edilen izolat sayısı, karbapenem türü, test yöntemi ve rehberlerdeki sınır değerlerin farklılığından kaynaklanmaktadır. Ülkemizde yapılan araştırmalarda klinik örneklerden izole edilen *B. fragilis* izolatlarında karbapenem direnci %0-%8, *cfiA* varlığı da %8-%33 arasında bildirilmiştir (82, 176, 178, 182). *CfiA* geni, upstream bölgesinde IS varlığına bağlı olarak çeşitli seviyelerde eksprese edilebilir (107). Ülger-Toprak ve ark. (82) *B. fragilis* izolatlarının genomunda %32 oranında IS1187 taşıdığını saptamış; IS'lerin %7.5 oranında *cfiA*'nın upstream bölgesinde yer aldığını ve bu genleri birlikte taşıyan izolatların meropeneme dirençli olduğunu belirtmişlerdir.

B. fragilis'te IS942, IS1186, IS1187, IS1188, IS612, IS613, IS614, IS615, IS616, IS4351 ve ISBf6'nın *cfiA* ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (107, 183). Bu çalışmada *B. fragilis*'te meropenem direnci %15.5 oranında, *cfiA*-pozitifliği de %16.9 oranında bulunmuştur. Beş izolatta (M3, M19, M29, M123, M172) *cfiA* geninin upstream bölgesinde IS [IS1187 (n=3), ISBf6 (n=1), IS612B (n=1)] saptanmıştır. Bu izolatların aynı zamanda yüksek karbapenem MİK değerlerine sahip oldukları görülmüştür. *CfiA*-pozitif ve *cfiA*-upstream bölgesinde IS saptanan izolatların yüksek imipenemaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. *CfiA*-pozitif, ancak *cfiA*-upstream bölgesinde IS saptanmayan ve fenotipik olarak karbapenemlere duyarlı izolatlarda (M35, M135, M185, M188) IS saptanan izolatlara göre daha düşük imipenemaz aktivitesi saptanmıştır. En düşük imipenemaz aktiviteleri ise *cfiA*-negatif izolatlarda (M23, M41, M175) gözlenmiştir (Bkz. Tablo 4.7.). *CfiA* geni varlığının düşük düzey imipenemaz aktivitesiyle, *cfiA*-upstream bölgesine IS eklenmesinin ise yüksek imipenemaz aktivitesiyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bir izolatta ise IS saptanmamasına rağmen, yüksek MİK değerleri ve imipenemaz aktivitesi tespit edilmiştir. Literatürde benzer izolatların varlığı bildirilmiş ve farklı bir *cfiA* aktivasyon mekanizması olabileceği öne sürülmüştür; ancak bu mekanizma net olarak ortaya konmamıştır (162, 184).

Çalışmamızda *cfiA* geni bulunan tüm izolatlarda meropenem MİK değerinin ≥ 2 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *cfiA* pozitif izolatlarda meropenem MİK değerleri imipeneme göre daha yüksek bulunmuştur ve *cfiA*-pozitif izolatlar meropenem MİK değerleriyle, imipeneme göre, daha uyumlu bir dağılım göstermiştir. EUCAST, güncel sınır değer tablolarında meropenem sınır değerlerinin (MİK > 1 µg/ml, disk zon çapı < 28 mm) *cfiA* aracılı direnci saptayabileceğini, ancak meropenem MİK değeri 1 µg/ml olan bazı izolatların da *cfiA* geni taşıyabileceğini belirtmiştir (116). Türkiye'de 63 *B. fragilis* izolatı ile yapılan bir çalışmada, imipenem ve meropenem MİK değerleri gradient test yöntemiyle belirlenmiş, *cfiA* geni varlığı ile yüksek meropenem MİK değerleri (MİK ≥ 0.5 µg/ml) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p < 0.0001$) (165). Bu çalışmalar arasında *cfiA* saptamak için belirlenen eşik değerlerde farklılıklar olsa da meropenem MİK değerleri ve *cfiA* varlığı arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (155). Bu bulgular, fenotipik test yapıldığında meropenemin karbapenem direncini saptamada imipeneme göre daha

duyarlı olduğuna işaret etmektedir. *CfiA* saptamak için önerilen meropenem eşik değerlerindeki farklılıkların kaynağı ise örneklem büyüklüğü, izolatların kökeni, kullanılan yöntemlerin birbirinden farklı olması olabilir.

Literatürde, bir *B. fragilis* suşu *cfiA*-pozitif ancak fenotipik olarak meropeneme duyarlı olduğunda, tedavide karbapenem kullanımının uygun olup olmadığı konusu tartışmalıdır. Bu tür mikrobiyolojik bulguların klinik etkileri hakkında çok az veri bulunmaktadır. İzolat fenotipik olarak duyarlı olsa bile, klinisyenlerin *cfiA*-pozitif *B. fragilis* enfeksiyonlarını karbapenemlerle tedavi etme konusunda dikkatli olmaları akılcı görünmektedir (185). Hastanın tedavisi sırasında meropenem MİK değerlerinde potansiyel bir artışı saptamak için takip kültürleri alınması ve meropenem MİK'inin izlenmesi önerilmektedir (142, 186). Ayrıca bir çalışmada, *B. fragilis*'te karbapenemlere karşı heterodirenç gözlemlenebileceği bildirilmiştir (158). Heterojen dirençli izolatlar genellikle karbapenemlerin seçici baskısından etkilenmektedir. Hashimoto ve ark. (187), direnç oranları göz önüne alındığında *Bacteroides spp.*'de ampirik karbapenem tedavisi uygulamasının yeniden değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Çalışmamızda meropenem direnci veya *cfiA* pozitifliği saptanan izolatların (n=15) 14'ünün kan izolatu olması dikkat çekicidir. Kan izolatlarında sefoksitin, piperasilin/tazobaktam, imipenem, meropenem direnci ve *cfiA* geni varlığı anlamlı ölçüde yüksek saptanmıştır. Jeverica ve ark. (142) da Slovenya'da kan izolatlarında *cfiA* prevalansının kan dışı izolatlara göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Bu sonuçlar karbapenem dirençli *B. fragilis* kan dolaşımı enfeksiyonlarının önemini, direnç trendinin takip edilmesinin ve anaeroplarda antimikrobiyal yönetim programlarının gerekliliğini göstermektedir.

Klindamisin direncinde en sık *erm* genleri aracılı mekanizma rol oynamaktadır. Çalışmamızda da en sık *ermF* geni olmak üzere *ermB* ve *ermG* genleri de tespit edilmiştir. Bununla birlikte çalışmamızda klindamisin direncinde rolü olduğu gösterilen *mefA*, *msrSA* ve *linA* genlerinin hem *B. fragilis* hem de diğer BFG türlerinde varlığı gösterilmiştir. Türkiye'de Tekeş ve ark. (188)'nin yaptığı bir çalışmada BFG izolatlarında (n=82) %54.9 klindamisin, %84,1 tetrasiklin ve %4,9 tigesiklin direnci saptanmıştır. İzolatlarda *ermF* (%57.3), *tetQ* (%51.2), *tetX* (%40.2), *tetX1* (%25.6), *tetM* (%31.7) ve *tet36* (%25.6) genlerinin yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir. Literatürde daha önce *Bacteroides spp.*'de direnç genlerinin aktarılmasında konjugatif

transpozonların önemli rol oynadığı gösterilmiştir (189). *ErmF* ve *tet* genlerinin CTnDOT üzerinde, *ermG*, *mefA* ve *msrSA* genlerinin CTnGERM1 üzerinde birlikte aktarıldığı bilinmektedir (8, 92, 190). Çalışmamızda, izolatlarımızın 51'inde (%36.9) *ermF* ve *tet* genlerinin birlikte bulunması, konjugatif transpozon CTnDOT'un varlığını düşündürmektedir (92). Ayrıca yedi izolatımızın *ermG*, *mefA* ve *msrSA* genlerini birlikte barındırması, bu izolatların muhtemelen konjugatif transpozon CTnGERM1'i taşıdığını düşündürmektedir (190). Eitel ve ark. (8)'nin yaptığı çok merkezli araştırmada bu paterne (*ermG*, *mefA* ve *msrSA*) sahip dokuz *B. fragilis* izolatından beşinin Türkiye'den olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda klindamisine duyarlı izolatların sekizinde *ermF*, üçünde *ermG* ve birinde *ermB* geni saptanmıştır. *Erm* genlerinin klindamisine duyarlı izolatlarda da saptanması indüklenebilir klindamisine direncine işaret etmektedir. Anaeroplarda indüklenebilir klindamisine direncini saptamak için henüz standart bir yöntem bulunmamaktadır. En duyarlı yöntem *erm* genlerinin moleküler tespiti (91).

Günümüzde BFG'de tetrasikline karşı >%80 oranında direnç görülmektedir. Bu nedenle artık BFG enfeksiyonlarının tedavisinde tetrasiklin kullanımı önerilmemektedir (15, 68). En yaygın direnç mekanizması *tetQ* geninin bir ribozomal koruma proteinini kodlamasıdır. *TetX* geni, oksijen varlığında tetrasiklini inaktive eden bir FAD ve NADPH gerektiren oksidoredüktaz kodlar, ancak ilginç bir şekilde *Bacteroides* spp. gibi zorunlu anaeroplarda varlığı gösterilmiştir (191). *TetX1* geni, yapısal olarak *tetX* geniyle %66 oranında benzerlik göstermektedir. Tigesiklinin, tetrasikline karşı kazanılan dirence neden olan eflüks pompalarından etkilenmediği ve ribozomal koruma proteinleri tarafından modifiye edilmiş bakteriyel ribozomlara bağlanabildiği ifade edilmektedir. Tigesiklin, komplike intraabdominal enfeksiyonların, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının yanı sıra polimikrobiyal etiyoloji, ÇİD patojenler veya eşlik eden anaerobik bakterilerden şüphelenilen enfeksiyonların tedavisinde önerilmektedir (192). Farklı sürveyans çalışmalarında tigesiklin direnç oranlarının genellikle %10'un altında olduğu belirtilmektedir (81, 192-194). Bizim çalışmamızda tigesiklin duyarlılığı %89.1 oranında saptanmıştır. Tüm izolatlarımızda *tetQ*, *tetX* ve *tetX1* oranları %76.1, %8 ve %37.7. bulunmuştur. Çalışmamızda *tetQ* ve *tetX1* genleri tigesikline azalmış duyarlılık gösteren izolatlarda daha sık bulunmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Bkz.

Tablo 4.3.). Ancak tigesikline azalmış duyarlılık gösteren yalnızca 15 izolatımız olması kısıtlayıcı bir faktördür. Eitel ve ark. (8)'nın çalışmasında 161 BFG izolatında sırasıyla 129 (80.1%), 16 (9.9%) ve 8 (5.0%) izolatta *tetQ*, *tetX* ve *tetX1* genleri tespit edilmiştir. *Tet* genlerinin prevalansı açısından *B. fragilis* ve diğer BFG izolatlarında bir fark bulunmamıştır. Üç *B. fragilis* izolatında tigesiklin direnci tespit edilmiş ve dirençli izolatların tümünde *tetQ* geni saptanmış, *tetX* ve *tetX1* genleri saptanmamıştır. Dirençli izolat sayısının az olması nedeniyle (n=3) tigesiklin direncinin direnç genleriyle ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Bartha ve ark. (96) da 35 *B. fragilis* izolatı ile yaptıkları çalışmada tigesiklin MİK değerleri yüksek izolatlarda *tet* genlerinin prevalansının daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Ancak sonuçların doğrulanması, direnç ve transfer mekanizmalarının aydınlatılması için geniş ölçekli, daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Metronidazol, anaerobik enfeksiyonların tedavisinde 1960'lardan bu yana uzun süreli kullanımına rağmen, Batı ülkelerinde %1'den daha az oranda direnç gelişen, oldukça etkili bir antibiyotiktir. Dünya çapında, BFG'de metronidazol duyarlılık oranları tüm türlerde yüksek (>%90) olmaya devam etmektedir (12). Ancak gelişmekte olan ülkelerde metronidazol direnç oranlarında artış gözlenmektedir (195). Hindistan'da yapılan bir araştırmada *B. fragilis* izolatlarında %41 oranında metronidazol direnci saptanmıştır (185). Pakistan'dan bir raporda, 2014-2017 yılları arasında toplanan BFG izolatlarında %20 oranında metronidazol direnci bildirilmiştir (196). Aynı bölgede 2010-2011 yıllarında toplanan BFG izolatlarıyla yapılan bir araştırmada da metronidazol direnci %3 oranında saptanmıştır (197). Bu durum metronidazol direncinde hızlı bir artış potansiyeli olduğunu göstermektedir (196, 197). Karbapenem ve metronidazole birlikte direnç görülmesi nadir olmakla beraber birçok bölgede bu tür izolatlar bildirilmiştir (7, 75, 198). Metronidazol direnci, çeşitli mekanizmalar (alternatif nitro-redüktaz yapımı, DNA onarımı veya efluks pompası) yoluyla ortaya çıkabilir; ancak en iyi karakterize edileni 1980'lerde ve 1990'larda esas olarak *Bacteroides* spp. için tanımlanan, *nim* genleri tarafından kontrol edilen mekanizmadır (199). *Nim* genlerinin ekspresyonu upstream bölgelerine yerleşen IS elemanları tarafından düzenlenmektedir. Fakat *nim* geni taşıyan her izolatta fenotipik metronidazol direnci saptanmadığı gibi, *nim* geninin ekspresyon düzeyleri ile metronidazol MİK değerleri arasında korelasyon görülmemektedir. Bu durum

metronidazol direncinde birden çok faktörün rol oynadığını göstermektedir (200). Türkiye’de ilk metronidazol dirençli *Bacteroides* spp. olgusu, 2013 yılında Ülger-Toprak ve ark. (201) tarafından kandan izole edilen bir *B. thetaiotamicron*’dur. İzolatın metronidazol MİK’inin 16 µg/mL olduğu saptanmıştır. Bu değer CLSI rehberine göre “I” kategorisinde yer almakla beraber, EUCAST kriterlerine göre dirençli kabul edilmiştir. İzolatta direnç mekanizması araştırıldığında PZR ile *nim* geni saptanmış, dizi analizi ile *nimE* olduğu ortaya konmuştur. Diğer yandan izolat karbapenemlere ve ampisilin/sulbaktama duyarlı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda metronidazol MİK değeri 16 µg/mL olan bir *B. fragilis* izolatında *nim* geni saptanmış, DNA dizilemesi ile *nimE* olduğu belirlenmiştir. Bu izolatın aynı zamanda sefoksitin, piperasilin/tazobaktam ve karbapenemlere de dirençli olduğu ve *cfiA*, *cfxA* ve *tetQ* genlerini barındırdığı saptanmıştır. İzolat klindamisin ve tigesikline duyarlı bulunmuştur. Kangaba ve ark. (178) çalışmalarında dört *B. fragilis* izolatının metronidazole dirençli olduğunu, bunlardan üçünün *nim* geni taşıdığını bildirmiştir. Ancak saptadıkları *nim* genlerinin alt tipi belirlenmemiştir. Husain ve ark. (202) 2013’te iki çok ilaca dirençli *B. fragilis* izolatında evrensel *nim* primerleri ile saptanamayan yeni bir *nim* geni (*nimJ*) tanımlamıştır. Kangaba ve ark. (178)’nın çalışmasındaki *nim* geni negatif olan metronidazol dirençli izolatta evrensel *nim* primerleri ile saptanamayan bir *nim* varyantı veya *nim* dışı direnç mekanizmaları olabileceği düşünülmüştür.

Bft B. fragilis’in virülansında rol oynayan faktörlerden biridir. ETBF izolatlarının bağırsakta asemptomatik taşınma oranının %6,2 ile %20,0 arasında (203-205) olduğu, ekstraintestinal *B. fragilis* suşları arasında ETBF prevalansının %9,0 ile %38,2 arasında olduğu bildirilmiştir (163, 203, 205-207). Kato ve ark. (208) kan kültürlerinden izole edilen *B. fragilis* izolatlarının diğer kaynaklardan izole edilen izolatlarla göre ETBF olma ihtimalinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde Claros ve ark. (206) da kan kültürlerinden izole edilen *B. fragilis* izolatlarının *bft* taşıma oranının diğer örneklerden izole edilen izolatlarla göre daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Ancak Sárvári ve ark. (163)’nın çalışmasında kandan ve diğer örneklerden izole edilen *B. fragilis* izolatlarında *bft* prevalansı açısından bir fark tespit edilmemiştir. Bizim *B. fragilis* izolatlarımızda da kan (n=40) ve kan dışı (n=31) izolatlar arasında *bft* taşıyıcılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark

bulunmamıştır. Kangaba ve ark. (178) *cepA*, *cfiA*, *ermF*, *nim* ve *tetQ* genlerinin *bft*-pozitif izolatlarda %100, %20, %80, %10 ve %100; *bft*-negatif izolatlarda %92,5, %10, %67,5, %5 ve %72,5 oranlarında bulunduğunu saptamıştır. *Bft*-pozitif izolatlarda direnç genlerinin oranı daha yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir. Benzer şekilde Kierzkowska ve ark. (209)'nın çalışmasında *bft*-pozitif ve *bft*-negatif izolatlar arasında penisilin G, klindamisin, sefoksitin, amoksisilin/klavulanik asit, imipenem ve metronidazol duyarlılıkları veya *cepA*, *cfxA*, *cfiA*, *ermF*, *ermB*, *ermG* ve *nim* genleri varlığı açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Jamal ve ark. (160) çalışmalarında *bft*-pozitif izolatlarda klindamisin ve tigesiklin direncinin *bft*-negatif izolatlara göre daha yüksek olduğunu, ancak sadece klindamisin direncinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede bir fark olduğunu belirtmişlerdir. Farklı olarak bizim çalışmamızda *bft*-negatif izolatlarda sefoksitin ($p=0.003$), piperasilin/tazobaktam ($p=0.006$), imipenem ($p=0.024$) ve meropeneme azalmış duyarlılık ($p=0.012$) ve *cfiA* ($p=0.006$) geni; *bft* pozitif izolatlarda ise *cepA* ($p=0.003$) ve *msrSA* ($p=0.031$) genleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek saptanmıştır. Sárvari ve ark. (163) *B. fragilis* enterotoksinin aktivasyonunda rol oynayan *fpn* geni ile *cfiA* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir negatif korelasyon bulunduğunu bildirmiştir. Bu bulguların önemi ve *B. fragilis* enfeksiyonlarının patogeneizindeki rolleri ile ilgili daha fazla araştırma gereklidir.

Literatürde BFG türlerinde genetik yakınlığın incelendiği çalışma sayısı kısıtlıdır. Kleivdal ve Hofstad (210) restriksiyon endonükleaz analizi ve ribotipleme ile 18 kan izolatında 14 farklı ribotip, dört fekal izolatta üç farklı ribotip göstermiştir. Khodaei ve ark. (211) çok lokuslu değişken sayılı ardışık tekrarların analizi (MLVA) ile 50 *B. fragilis* izolatında 27 farklı MLVA tipi saptamıştır. Vallim ve ark. (212) 71 *B. fragilis* izolatında AP-PCR ve Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) yöntemlerini karşılaştırmıştır. İzolatların AP-PCR ile dokuz farklı, PFGE ile 25 farklı tipe ayrıldığını saptamış ve PFGE'nin ayırım gücünün AP-PCR'a göre daha iyi olduğu sonucuna varmışlardır. Martirosian ve ark. (213) ve Meisel-Mikolajczyk ve ark. (214), Polonya'da çeşitli kaynaklardan izole edilen ETBF izolatlarını AP-PCR yöntemiyle referans izolatlarla genotipik olarak karşılaştırmıştır. Bu araştırmacılar, analiz edilen tüm izolatlar arasında çok az benzerlik bulmuş ve incelenen ETBF izolatlarının poliklonal olduğu sonucuna varmışlardır. Moraes ve ark. (215) AP-PCR ile 33 *B.*

fragilis izolatında 25 farklı genotip saptanmıştır. Sarma ve ark. (216) insanlardan izole edilen 20 *B. fragilis* izolatının on sekiz farklı genotipe ayrıldığını tespit etmiştir. Çalışmamızda 138 klinik BFG izolatları arasında yüksek derecede heterojenite (101 farklı genotip) saptanmıştır. *B. fragilis* (n=71) izolatlarımızda 49, ETBF (n=23) izolatlarımızda 18 farklı genotip saptanmıştır. Bulgularımız ve literatürdeki veriler *Bacteroides* spp.'de yüksek düzeyde genetik çeşitlilik olduğunu desteklemektedir. *Bacteroides* spp.'de bağırsakta diğer bakteri türleriyle temasın, genetik alışverişe bağlı olarak yüksek genomik rekombinasyon sıklığı sağladığı ve evrimlerinde önemli bir faktör olduğu öne sürülmüştür (189, 212). Çalışmamızın kısıtlılığı genetik yakınlığın incelenmesinde kullandığımız AP-PCR'ın tekrarlanabilirliğini test etmek için birden fazla kez çalışılmamasıdır. PZR temelli tiplendirme yöntemlerinde laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliklerinin düşük olması en önemli dezavantajdır (217).

Yakın zamanda Nielsen ve ark. (218) *B. fragilis* izolatlarında genetik yakınlığın incelenmesi için ilk defa bir multilokus dizi tiplendirmesi (MLST) şeması oluşturmuştur. Şema, korunan yedi gen [*groL* (*hsp60*), *rpoB*, *recA*, *dnaJ*, *rprX*, *prfA* ve *fusA* arasında kalan bölgelerin PZR ile çoğaltılması ve oluşan PZR ürünlerinin dizi analizine dayanmaktadır. Şemanın, *B. fragilis* izolatlarını suş düzeyinde ayırt edebildiği kanıtlanmıştır. Bu çalışmada toplamda 567 *B. fragilis* genomunun dizi tipi belirlenmiş ve izolat verileri toplanmıştır. Bu şema ile *B. fragilis*'in global olarak standart bir yöntemle tiplendirilmesi ve izlenmesi amaçlanmaktadır. *B. fragilis*'in yakından izlenmesi özellikle geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı giderek daha dirençli hale gelmesi ve diğer bakterilerle horizontal gen aktarımı yapması nedeniyle önemlidir. Ek olarak, şema potansiyel olarak *Bacteroides* cinsinin diğer türlerine de uygulanabilir (218).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Anaerop bakterilerin laboratuvar tanısı, klinik bakteriyoloji laboratuvarlarında yaşanan zorluklardan biridir. Anaerop bakterilerin izolasyonu, tanımlaması ve ADT'leri zaman alıcı ve emek yoğundur. Bu nedenle anaerop bakteriler birçok laboratuvar da rutin tanı ve/veya ADT akışından çıkarılmaktadır (149, 160). Son yıllarda, önceki dekatlara göre anaerop bakterilerde antibiyotik direnç oranlarında artış olduğu bildirilmektedir (5). Direnci etkileyen faktörler tür, ülke, merkez, antibiyotik tüketimi ve örnek tipidir.

Çalışmamızda dört yıllık bir dönemde izole edilen 138 BFG izolatının antibiyotik duyarlılık profili referans agar dilüsyon yöntemiyle belirlenmiş, antibiyotik direncinin genetik mekanizmaları araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

1) Metronidazol, tüm BFG izolatlarına karşı *in vitro* en etkili antibiyotik olarak saptanmıştır ve BFG enfeksiyonlarının ampirik tedavisi için birinci basamak antibiyotik olarak düşünülmelidir.

2) Sefoksitin, klindamisin ve beta laktam/beta laktamaz inhibitörlerine duyarlılık oranları, özellikle *B. fragilis* dışı BFG türlerinde olmakla birlikte, her iki grupta da düşük saptanmıştır ve ampirik tedavide tercih edilmemelidir.

3) Klindamisin direncinin ve direnç genlerinin (*ermF*, *ermG*, *ermB*, *mefA*, *msrSA*, *linA*) BFG'de yaygın olarak bulunduğu gözlenmiştir.

4) Sefoksitin MİK değerleri ile *cfxA* varlığı arasında bir korelasyon olmadığı saptanmıştır. Farklı direnç mekanizmalarının (PBP değişikliği, efluks) sefoksitin direncinde rol oynadığı düşünülmüştür.

5) *B. fragilis* izolatlarında saptanan yüksek karbapenem direnci ve *cfiA* pozitifliği endişe vericidir. *B. fragilis* ile gelişen ciddi enfeksiyonlarda ampirik karbapenem tedavisi ile klinik başarısızlık görülebilir ve fatal sonuçlar ortaya çıkabilir.

6) Geniş spektrumu nedeniyle ÇİD patojenlerle meydana gelen intraabdominal enfeksiyonların ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilen tigesikline karşı azalmış duyarlılık gösteren BFG izolatları olduğu belirlenmiştir.

Ciddi enfeksiyonlarda tedavide tigesiklin tercih edilecekse öncesinde ADT yapılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

7) *Bft*-negatif *B. fragilis* izolatlarında sefoksitin, piperasilin/tazobaktam, imipenem ve meropenem azalmış duyarlılık ve *cfiA* geni varlığının daha yaygın olduğu gözlenmiştir. Kan ve kan dışı izolatlarda *bft* varlığı açısından fark saptanmamıştır. *Bft* geninin ekstraintestinal enfeksiyonlarda patogenezdaki rolü ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

8) AP-PCR ile BFG’de yüksek düzeyde genetik çeşitlilik olduğu saptanmıştır. AP-PCR’ın ucuz, hızlı ve basit bir yöntem olması sayesinde BFG’nin yerel epidemiyolojik analizinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Ancak uluslararası düzeyde karşılaştırmalar yapmak için MLST veya WGS yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir.

9) BFG’de birçok antibiyotik grubuna direnç görülmesi, ÇİD izolatlar saptanması nedeniyle yeni antibiyotiklerin ve kombinasyon tedavilerinin etkinliğini değerlendiren çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Sonuç olarak, anaerob bakterilerde antibiyotik direnç oranları değişkenlik göstermektedir. Sürveyans çalışmaları, anaerob bakterilerin bölgesel, ulusal ve küresel direnç modelleri hakkındaki bilgileri genişletmek için önemlidir. Anaerob bakterilerde antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanmasının ve düzenli aralıklarla yapılacak ulusal antibiyotik direnç araştırmalarının giderek daha değerli hale geldiği sonucuna varılmıştır. Yakın zamanda EUCAST’ın anaeroplara için disk difüzyon yöntemini geliştirmesi, rutin laboratuvar akışına anaerob ADT’nin dahil edilmesi için teşvik edicidir. Anaerob bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların, yüksek oranda mortalite ve morbiditeye neden olabilmesi, tedavi etkinliğinin cins ve türler arasındaki direnç farklılıkları nedeniyle değişkenlik göstermesinden dolayı anaerob bakterilerin cins ve tür düzeyinde tanımlanması ve ADT uygulanması gerektiği düşünülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. Wexler HM. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. Clin Microbiol Rev. 2007;20(4):593-621.
2. Demir-Çuha M, Hazirolan G. Anaerobic bacteria isolated from blood cultures in hacettepe university faculty of medicine hospital between 2017 and 2019: A three-year evaluation. Klimik Dergisi. 2020;33(3):286-91.
3. Kim J, Lee Y, Park Y, Kim M, Choi JY, Yong D, et al. Anaerobic Bacteremia: Impact of Inappropriate Therapy on Mortality. Infect Chemother. 2016;48(2):91-8.
4. Cheng CW, Lin HS, Ye JJ, Yang CC, Chiang PC, Wu TS, et al. Clinical significance of and outcomes for Bacteroides fragilis bacteremia. J Microbiol Immunol Infect. 2009;42(3):243-50.
5. Boyanova L, Kolarov R, Mitov I. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. Anaerobe. 2015;31:4-10.
6. Wallace MJ, Jean S, Wallace MA, Burnham CD, Dantas G. Comparative Genomics of Bacteroides fragilis Group Isolates Reveals Species-Dependent Resistance Mechanisms and Validates Clinical Tools for Resistance Prediction. mBio. 2022;13(1):e0360321.
7. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Goldstein EJ, Harrell L, Jenkins SG, et al. Trends in antimicrobial resistance among Bacteroides species and Parabacteroides species in the United States from 2010-2012 with comparison to 2008-2009. Anaerobe. 2017;43:21-6.
8. Eitel Z, Soki J, Urban E, Nagy E, Infection ESGoA. The prevalence of antibiotic resistance genes in Bacteroides fragilis group strains isolated in different European countries. Anaerobe. 2013;21:43-9.
9. Skerman VBD, McGOWAN V, Sneath PHA. Approved Lists of Bacterial Names. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1980;30(1):225-420.
10. Sakamoto M, Benno Y. Reclassification of Bacteroides distasonis, Bacteroides goldsteinii and Bacteroides merdae as Parabacteroides distasonis gen. nov., comb. nov., Parabacteroides goldsteinii comb. nov. and Parabacteroides merdae comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2006;56(7):1599-605.
11. García-López M, Meier-Kolthoff JP, Tindall BJ, Gronow S, Woyke T, Kyrpides NC, et al. Analysis of 1,000 Type-Strain Genomes Improves Taxonomic Classification of Bacteroidetes. Frontiers in Microbiology. 2019;10.
12. Jean S, Wallace MJ, Dantas G, Burnham CD. Time for Some Group Therapy: Update on Identification, Antimicrobial Resistance, Taxonomy, and Clinical Significance of the Bacteroides fragilis Group. J Clin Microbiol. 2022;60(9):e0236120.
13. Finegold SM. Host factors predisposing to anaerobic infections. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 1993;6(2):159-63.
14. Park Y, Choi JY, Yong D, Lee K, Kim JM. Clinical features and prognostic factors of anaerobic infections: a 7-year retrospective study. Korean J Intern Med. 2009;24(1):13-8.
15. Brook I. Spectrum and treatment of anaerobic infections. J Infect Chemother. 2016;22(1):1-13.

16. Brook I, Myhal ML. Adherence of *Bacteroides fragilis* group species. *Infect Immun*. 1991;59(2):742-4.
17. Yekani M, Baghi HB, Naghili B, Vahed SZ, SÓki J, Memar MY. To resist and persist: Important factors in the pathogenesis of *Bacteroides fragilis*. *Microb Pathog*. 2020;149:104506.
18. Domingues RM, Cavalcanti SM, Andrade AF, Ferreira MC. Sialic acid as receptor of *Bacteroides fragilis* lectin-like adhesin. *Zentralbl Bakteriol*. 1992;277(3):340-4.
19. Weintraub A, Larsson BE, Lindberg AA. Chemical and immunochemical analyses of *Bacteroides fragilis* lipopolysaccharides. *Infect Immun*. 1985;49(1):197-201.
20. Rotimi VO, Verghese TL, Al-Sweih N, Khodakhast FB, Ahmed K. Influence of five antianaerobic antibiotics on endotoxin liberation by gram-negative anaerobes. *J Chemother*. 2000;12(1):40-7.
21. Beena VK, Shivananda PG. In vitro adhesiveness of *Bacteroides fragilis* group in relation to encapsulation. *Indian J Med Res*. 1997;105:258-61.
22. Troy EB, Carey VJ, Kasper DL, Comstock LE. Orientations of the *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharide biosynthesis locus promoters during symbiosis and infection. *J Bacteriol*. 2010;192(21):5832-6.
23. Coyne MJ, Tzianabos AO, Mallory BC, Carey VJ, Kasper DL, Comstock LE. Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun*. 2001;69(7):4342-50.
24. Johnson JL, Jones MB, Cobb BA. Polysaccharide A from the capsule of *Bacteroides fragilis* induces clonal CD4⁺ T cell expansion. *J Biol Chem*. 2015;290(8):5007-14.
25. Ramakrishna C, Kujawski M, Chu H, Li L, Mazmanian SK, Cantin EM. *Bacteroides fragilis* polysaccharide A induces IL-10 secreting B and T cells that prevent viral encephalitis. *Nat Commun*. 2019;10(1):2153.
26. Riepe SP, Goldstein J, Alpers DH. Effect of secreted *Bacteroides* proteases on human intestinal brush border hydrolases. *J Clin Invest*. 1980;66(2):314-22.
27. Lobo LA, Jenkins AL, Jeffrey Smith C, Rocha ER. Expression of *Bacteroides fragilis* hemolysins in vivo and role of HlyBA in an intra-abdominal infection model. *Microbiologyopen*. 2013;2(2):326-37.
28. Robertson KP, Smith CJ, Gough AM, Rocha ER. Characterization of *Bacteroides fragilis* hemolysins and regulation and synergistic interactions of HlyA and HlyB. *Infect Immun*. 2006;74(4):2304-16.
29. Zakharzhetskaya NB, Vanyushkina AA, Altukhov IA, Shavarda AL, Butenko IO, Rakitina DV, et al. Outer membrane vesicles secreted by pathogenic and nonpathogenic *Bacteroides fragilis* represent different metabolic activities. *Sci Rep*. 2017;7(1):5008.
30. Avelar KE, Pinto LJ, Antunes LC, Lobo LA, Bastos MC, Domingues RM, et al. Production of bacteriocin by *Bacteriodes fragilis* and partial characterization. *Lett Appl Microbiol*. 1999;29(4):264-8.
31. Wilson MM, Anderson DE, Bernstein HD. Analysis of the outer membrane proteome and secretome of *Bacteroides fragilis* reveals a multiplicity of secretion mechanisms. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117732.

32. Russell AB, Wexler AG, Harding BN, Whitney JC, Bohn AJ, Goo YA, et al. A type VI secretion-related pathway in *Bacteroidetes* mediates interbacterial antagonism. *Cell Host Microbe*. 2014;16(2):227-36.
33. Coyne MJ, Roelofs KG, Comstock LE. Type VI secretion systems of human gut *Bacteroidales* segregate into three genetic architectures, two of which are contained on mobile genetic elements. *BMC Genomics*. 2016;17:58.
34. Sana TG, Lugo KA, Monack DM. T6SS: The bacterial "fight club" in the host gut. *PLoS Pathog*. 2017;13(6):e1006325.
35. Russell AB, Hood RD, Bui NK, LeRoux M, Vollmer W, Mougous JD. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*. 2011;475(7356):343-7.
36. Chatzidaki-Livanis M, Geva-Zatorsky N, Comstock LE. *Bacteroides fragilis* type VI secretion systems use novel effector and immunity proteins to antagonize human gut *Bacteroidales* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(13):3627-32.
37. Wu S, Lim KC, Huang J, Saidi RF, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14979-84.
38. Scott N, Whittle E, Jeraldo P, Chia N. A systemic review of the role of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in colorectal cancer. *Neoplasia*. 2022;29:100797.
39. Wu S, Powell J, Mathioudakis N, Kane S, Fernandez E, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces intestinal epithelial cell secretion of interleukin-8 through mitogen-activated protein kinases and a tyrosine kinase-regulated nuclear factor-kappaB pathway. *Infect Immun*. 2004;72(10):5832-9.
40. Cerdeño-Tárraga AM, Patrick S, Crossman LC, Blakely G, Abratt V, Lennard N, et al. Extensive DNA inversions in the *B. fragilis* genome control variable gene expression. *Science*. 2005;307(5714):1463-5.
41. Kuwahara T, Yamashita A, Hirakawa H, Nakayama H, Toh H, Okada N, et al. Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(41):14919-24.
42. Nakayama-Imaohji H, Hirakawa H, Ichimura M, Wakimoto S, Kuhara S, Hayashi T, et al. Identification of the site-specific DNA invertase responsible for the phase variation of *SusC/SusD* family outer membrane proteins in *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol*. 2009;191(19):6003-11.
43. Weinacht KG, Roche H, Krinos CM, Coyne MJ, Parkhill J, Comstock LE. Tyrosine site-specific recombinases mediate DNA inversions affecting the expression of outer surface proteins of *Bacteroides fragilis*. *Molecular Microbiology*. 2004;53(5):1319-30.
44. Nakayama-Imaohji H, Hirota K, Yamasaki H, Yoneda S, Nariya H, Suzuki M, et al. DNA Inversion Regulates Outer Membrane Vesicle Production in *Bacteroides fragilis*. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148887.
45. Chatzidaki-Livanis M, Coyne MJ, Roche-Hakansson H, Comstock LE. Expression of a uniquely regulated extracellular polysaccharide confers a large-capsule phenotype to *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol*. 2008;190(3):1020-6.
46. Coyne MJ, Weinacht KG, Krinos CM, Comstock LE. *Mpi* recombinase globally modulates the surface architecture of a human commensal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10446-51.

47. Baughn AD, Malamy MH. The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature*. 2004;427(6973):441-4.
48. Smalley D, Rocha ER, Smith CJ. Aerobic-type ribonucleotide reductase in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol*. 2002;184(4):895-903.
49. Meehan BM, Malamy MH. Fumarate reductase is a major contributor to the generation of reactive oxygen species in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *Microbiology (Reading)*. 2012;158(Pt 2):539-46.
50. Lu Z, Imlay JA. When anaerobes encounter oxygen: mechanisms of oxygen toxicity, tolerance and defence. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(12):774-85.
51. Sund CJ, Rocha ER, Tzianabos AO, Wells WG, Gee JM, Reott MA, et al. The *Bacteroides fragilis* transcriptome response to oxygen and H₂O₂: the role of OxyR and its effect on survival and virulence. *Mol Microbiol*. 2008;67(1):129-42.
52. Rocha ER, Tzianabos AO, Smith CJ. Thioredoxin reductase is essential for thiol/disulfide redox control and oxidative stress survival of the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol*. 2007;189(22):8015-23.
53. Rocha ER, de Uzeda M, Brock JH. Effect of ferric and ferrous iron chelators on growth of *Bacteroides fragilis* under anaerobic conditions. *FEMS Microbiology Letters*. 1991;84(1):45-50.
54. Sperry JF, Appleman MD, Wilkins TD. Requirement of heme for growth of *Bacteroides fragilis*. *Appl Environ Microbiol*. 1977;34(4):386-90.
55. Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma BK, Bhattacharjee S, Tribedi P. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016;23(5):3984-99.
56. Zhu W, Winter MG, Spiga L, Hughes ER, Chanin R, Mulgaonkar A, et al. Xenosiderophore Utilization Promotes *Bacteroides thetaiotaomicron* Resilience during Colitis. *Cell Host Microbe*. 2020;27(3):376-88.e8.
57. Rocha ER, Krykunivsky AS. Anaerobic utilization of Fe(III)-xenosiderophores among *Bacteroides* species and the distinct assimilation of Fe(III)-ferrichrome by *Bacteroides fragilis* within the genus. *Microbiologyopen*. 2017;6(4).
58. Rocha ER, Bergonia HA, Gerdes S, Jeffrey Smith C. *Bacteroides fragilis* requires the ferrous-iron transporter FeoAB and the CobN-like proteins BtuS1 and BtuS2 for assimilation of iron released from heme. *Microbiologyopen*. 2019;8(4):e00669.
59. Macfarlane S, Woodmansey EJ, Macfarlane GT. Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(11):7483-92.
60. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3380-9.
61. Zhao A, Sun J, Liu Y. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1137947.
62. Nagy E. Anaerobic infections: update on treatment considerations. *Drugs*. 2010;70(7):841-58.
63. Cobo F. Infections Caused by Anaerobic Microorganisms. In: Rezaei N, editor. *Encyclopedia of Infection and Immunity*. Oxford: Elsevier; 2022. p. 614-27.
64. Goldstein EJ. Anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis*. 1996;23 Suppl 1:S97-101.

65. Nagy E, Boyanova L, Justesen US. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(11):1139-48.
66. Ransom EM, Alipour Z, Wallace MA, Burnham CA. Evaluation of Optimal Blood Culture Incubation Time To Maximize Clinically Relevant Results from a Contemporary Blood Culture Instrument and Media System. *J Clin Microbiol.* 2021;59(3).
67. AL L. Clinical microbiology procedures handbook, 4th ed American Society of Microbiology, Washington, DC.; 2016.
68. Gajdács M, Spengler G, Urbán E. Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical Microbiology? *Antibiotics (Basel).* 2017;6(4).
69. Jousimies-Somer H, Sutter VL. Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual. 6th ed. ed. Belmont, CA: Star Pub.; 2002.
70. Cordovana M, Pranada AB, Ambretti S, Kostrzewa M. MALDI-TOF bacterial subtyping to detect antibiotic resistance. *Clin Mass Spectrom.* 2019;14 Pt A:3-8.
71. Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(8):796-802.
72. Bächli P, Baars S, Simmler A, Zbinden R, Schulthess B. Impact of MALDI-TOF MS identification on anaerobic species and genus diversity in routine diagnostics. *Anaerobe.* 2022;75:102554.
73. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Goldstein EJ, Harrell L, et al. Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006-2009. *Anaerobe.* 2011;17(4):147-51.
74. Boyanova L, Markovska R, Mitov I. Multidrug resistance in anaerobes. *Future Microbiol.* 2019;14:1055-64.
75. Soki J, Hedberg M, Patrick S, Balint B, Herczeg R, Nagy I, et al. Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(9):2441-8.
76. Boiten KE, Kuijper EJ, Schuele L, van Prehn J, Bode LGM, Maat I, et al. Characterization of mobile genetic elements in multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* isolates from different hospitals in the Netherlands. *Anaerobe.* 2023;81:102722.
77. Sood A, Ray P, Angrup A. Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: In routine and research. *Anaerobe.* 2022;75:102559.
78. Then RL, Angehrn P. Low trimethoprim susceptibility of anaerobic bacteria due to insensitive dihydrofolate reductases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979;15(1):1-6.
79. Bryan LE, Kowand SK, Van Den Elzen HM. Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979;15(1):7-13.
80. Wexler HM, Halebian S. Alterations to the penicillin-binding proteins in the *Bacteroides fragilis* group: a mechanism for non-beta-lactamase mediated cefoxitin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 1990;26(1):7-20.
81. Wu PH, Chen CH, Lin HH, Tseng KH, Ko WC, Ho MW, et al. Geographic patterns of antimicrobial susceptibilities for *Bacteroides* species worldwide: results from the Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) program, 2007-2020. *Int J Antimicrob Agents.* 2023:106822.

82. Toprak NU, Uzunkaya OD, Sóki J, Soyletir G. Susceptibility profiles and resistance genes for carbapenems (*cfiA*) and metronidazole (*nim*) among *Bacteroides* species in a Turkish University Hospital. *Anaerobe*. 2012;18(1):169-71.
83. Sóki J, Lang U, Schumacher U, Nagy I, Berényi Á, Fehér T, et al. A novel *Bacteroides metallo-β-lactamase* (MBL) and its gene (*crxA*) in *Bacteroides xylanisolvens* revealed by genomic sequencing and functional analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2022;77(6):1553-6.
84. Odou MF, Singer E, Romond MB, Dubreuil L. Isolation and characterization of a porin-like protein of 45 kilodaltons from *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 1998;166(2):347-54.
85. Behra-Mielliet J, Calvet L, Dubreuil L. A *Bacteroides thetaiotamicron* porin that could take part in resistance to beta-lactams. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;24(2):135-43.
86. Pumbwe L, Ueda O, Yoshimura F, Chang A, Smith RL, Wexler HM. *Bacteroides fragilis* BmeABC efflux systems additively confer intrinsic antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;58(1):37-46.
87. Pumbwe L, Chang A, Smith RL, Wexler HM. Clinical significance of overexpression of multiple RND-family efflux pumps in *Bacteroides fragilis* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(3):543-8.
88. Ueda O, Wexler HM, Hirai K, Shibata Y, Yoshimura F, Fujimura S. Sixteen homologs of the mex-type multidrug resistance efflux pump in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(7):2807-15.
89. Ghotaslou R, Yekani M, Memar MY. The role of efflux pumps in *Bacteroides fragilis* resistance to antibiotics. *Microbiol Res*. 2018;210:1-5.
90. Wexler HM. Pump it up: occurrence and regulation of multi-drug efflux pumps in *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe*. 2012;18(2):200-8.
91. Johnsen BO, Handal N, Meisal R, Bjørnholt JV, Gaustad P, Leegaard TM. *erm* gene distribution among Norwegian *Bacteroides* isolates and evaluation of phenotypic tests to detect inducible clindamycin resistance in *Bacteroides* species. *Anaerobe*. 2017;47:226-32.
92. Waters JL, Salyers AA. Regulation of CTnDOT Conjugative Transfer Is a Complex and Highly Coordinated Series of Events. *mBio*. 2013;4(6):e00569-13.
93. Wang J, Shoemaker NB, Wang GR, Salyers AA. Characterization of a *Bacteroides* mobilizable transposon, NBU2, which carries a functional lincomycin resistance gene. *J Bacteriol*. 2000;182(12):3559-71.
94. Britz ML, Wilkinson RG. Chloramphenicol acetyltransferase of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1978;14(1):105-11.
95. Balbi HJ. Chloramphenicol: a review. *Pediatr Rev*. 2004;25(8):284-8.
96. Bartha NA, Sóki J, Urbán E, Nagy E. Investigation of the prevalence of *tetQ*, *tetX* and *tetX1* genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline minimum inhibitory concentrations. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(6):522-5.
97. Snyderman DR, McDermott LA, Jacobus NV, Kerstein K, Grossman TH, Sutcliffe JA. Evaluation of the In Vitro Activity of Eravacycline against a Broad Spectrum of Recent Clinical Anaerobic Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(5).
98. Goldstein EJC, Citron DM, Tyrrell KL. In vitro activity of eravacycline and comparator antimicrobials against 143 recent strains of *Bacteroides* and *Parabacteroides* species. *Anaerobe*. 2018;52:122-4.

99. Oh H, Edlund C. Mechanism of quinolone resistance in anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(6):512-7.
100. Stein GE, Goldstein EJC. Fluoroquinolones and Anaerobes. *Clinical Infectious Diseases.* 2006;42(11):1598-607.
101. Miyamae S, Nikaido H, Tanaka Y, Yoshimura F. Active efflux of norfloxacin by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(8):2119-21.
102. Miyamae S, Ueda O, Yoshimura F, Hwang J, Tanaka Y, Nikaido H. A MATE family multidrug efflux transporter pumps out fluoroquinolones in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(12):3341-6.
103. Akhi MT, Ghotaslou R, Alizadeh N, Yekani M, Beheshtirouy S, Asgharzadeh M, et al. nim gene-independent metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis* in surgical site infections. *GMS Hyg Infect Control.* 2017;12:Doc13.
104. Alauzet C, Lozniewski A, Marchandin H. Metronidazole resistance and nim genes in anaerobes: A review. *Anaerobe.* 2019;55:40-53.
105. Ghotaslou R, Bannazadeh Baghi H, Alizadeh N, Yekani M, Arbabi S, Memar MY. Mechanisms of *Bacteroides fragilis* resistance to metronidazole. *Infect Genet Evol.* 2018;64:156-63.
106. Paunkov A, Hummel K, Strasser D, Sóki J, Leitsch D. Proteomic analysis of metronidazole resistance in the human facultative pathogen *Bacteroides fragilis*. *Front Microbiol.* 2023;14:1158086.
107. J. S. Extended role for insertion sequence elements in the antibiotic resistance of *Bacteroides*. *World J Clin Infect Dis* 2013;3:1-12.
108. Sarkar A, Pazhani GP, Dharanidharan R, Ghosh A, Ramamurthy T. Detection of integron-associated gene cassettes and other antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe.* 2015;33:18-24.
109. Sárvári KP, Sóki J, Kristóf K, Juhász E, Miszti C, Melegh SZ, et al. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Bacteroides* isolates from Hungarian clinical samples. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018;13:65-9.
110. Merchan C, Parajuli S, Siegfried J, Scipione MR, Dubrovskaya Y, Rahimian J. Multidrug-Resistant *Bacteroides fragilis* Bacteremia in a US Resident: An Emerging Challenge. *Case Rep Infect Dis.* 2016;2016:3607125.
111. Sóki J, Hedberg M, Patrick S, Bálint B, Herczeg R, Nagy I, et al. Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2016;71(9):2441-8.
112. Brook I, Wexler HM, Goldstein EJ. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(3):526-46.
113. Schuetz AN. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis.* 2014;59(5):698-705.
114. CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. 9th ed. CLSI standard M11. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
115. CLSI. M100-ED33:2023 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition. 2023.
116. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Breakpoints (v13.0). 2023.
117. EUCAST. Anaerobic bacteria - disk diffusion methodology v 2.0 The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; January 2023. https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology.

118. Dowzicky MJ, Nadler HL, Sheikh W. Comparison of sensititre broth microdilution and agar dilution susceptibility testing techniques for meropenem to determine accuracy, reproducibility, and predictive values. *J Clin Microbiol.* 1994;32(9):2204-7.
119. Cherkaoui A, Fischer A, Azam N, Riat A, Schrenzel J. A comparison of Sensititre™ Anaerobe MIC plate with ATB ANA® test for the routine susceptibility testing of common anaerobe pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(12):2279-84.
120. Hughes C, Ashhurst-Smith C, Ferguson JK. Gram negative anaerobe susceptibility testing in clinical isolates using Sensititre and Etest methods. *Pathology.* 2018;50(4):437-41.
121. Sood A, Angrup A, Ray P, Bala K. Comparative evaluation of agar dilution and broth microdilution by commercial and in-house plates for *Bacteroides fragilis* group: An economical and expeditious approach for resource-limited settings. *Anaerobe.* 2021;71:102443.
122. Rennie RP, Turnbull L, Brosnikoff C, Cloke J. First comprehensive evaluation of the M.I.C. evaluator device compared to Etest and CLSI reference dilution methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical strains of anaerobes and other fastidious bacterial species. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1153-7.
123. Goldstein EJC, Citron DM. Resistance Trends in Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter.* 2011;33(1):1-8.
124. Rosenblatt JE, Gustafson DR. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1995;22(3):279-84.
125. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 1991;29(10):2197-203.
126. Rentenaar RJ, Bovo-Heijmans B, Diggle J, Fluit AC, Wootton M. False amoxicillin/clavulanic acid susceptibility in *Bacteroides fragilis* using gradient strip tests. *Anaerobe.* 2021;69:102358.
127. Cormican MG, Erwin ME, Jones RN. False resistance to metronidazole by E-test among anaerobic bacteria investigations of contributing test conditions and medium quality. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1996;24(2):117-9.
128. Sóki J, Eitel Z, Urbán E, Nagy E. Molecular analysis of the carbapenem and metronidazole resistance mechanisms of *Bacteroides* strains reported in a Europe-wide antibiotic resistance survey. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;41(2):122-5.
129. Wexler HM, Molitoris E, Jashnian F, Finegold SM. Comparison of spiral gradient and conventional agar dilution for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(6):1196-202.
130. Wexler HM, Molitoris E, Murray PR, Washington J, Zabransky RJ, Edelstein PH, et al. Comparison of spiral gradient endpoint and agar dilution methods for susceptibility testing of anaerobic bacteria: a multilaboratory collaborative evaluation. *J Clin Microbiol.* 1996;34(1):170-4.
131. Hill GB, Schalkowsky S. Development and evaluation of the spiral gradient endpoint method for susceptibility testing of anaerobic gram-negative bacilli. *Rev Infect Dis.* 1990;12 Suppl 2:S200-9.
132. Wikins TD, Holdeman LV, Abramson IJ, Moore WE. Standardized single-disc method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1972;1(6):451-9.

133. Dornbusch K, Nord CE, Olsson B. Antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria by the standardized disc diffusion method with special reference to *Bacteroides fragilis*. *Scand J Infect Dis*. 1975;7(1):59-66.
134. Nagy E, Justesen US, Eitel Z, Urbán E. Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates. *Anaerobe*. 2015;31:65-71.
135. Barry AL, Fuchs PC, Gerlach EH, Allen SD, Acar JF, Aldridge KE, et al. Multilaboratory evaluation of an agar diffusion disk susceptibility test for rapidly growing anaerobic bacteria. *Rev Infect Dis*. 1990;12 Suppl 2:S210-7.
136. Horn R, Bourgault AM, Lamothe F. Disk diffusion susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987;31(10):1596-9.
137. Brazier JS, Goldstein EJ, Citron DM, Ostovari MI. Fastidious anaerobe agar compared with Wilkins-Chalgren agar, brain heart infusion agar, and brucella agar for susceptibility testing of *Fusobacterium* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(11):2280-2.
138. Bavelaar H, Justesen US, Morris TE, Anderson B, Copsey-Mawer S, Stubhaug TT, et al. Development of a EUCAST disk diffusion method for the susceptibility testing of rapidly growing anaerobic bacteria using Fastidious Anaerobe Agar (FAA): a development study using *Bacteroides* species. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(11):1695.e1-.e6.
139. Matuschek E, Copsey-Mawer S, Petersson S, Åhman J, Morris TE, Kahlmeter G. The European committee on antimicrobial susceptibility testing disc diffusion susceptibility testing method for frequently isolated anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2023.
140. Florio W, Baldeschi L, Rizzato C, Tavanti A, Ghelardi E, Lupetti A. Detection of Antibiotic-Resistance by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Expanding Area. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:572909.
141. Nagy E, Becker S, Sóki J, Urbán E, Kostrzewa M. Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology*. 2011;60(11):1584-90.
142. Jeverica S, Sóki J, Premru MM, Nagy E, Papst L. High prevalence of division II (cfiA positive) isolates among blood stream *Bacteroides fragilis* in Slovenia as determined by MALDI-TOF MS. *Anaerobe*. 2019;58:30-4.
143. Kawamoto Y, Kosai K, Ota K, Uno N, Sakamoto K, Hasegawa H, et al. Rapid detection and surveillance of cfiA-positive *Bacteroides fragilis* using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anaerobe*. 2021;72:102448.
144. Wybo I, De Bel A, Soetens O, Echahidi F, Vandoorslaer K, Van Cauwenbergh M, et al. Differentiation of cfiA-negative and cfiA-positive *Bacteroides fragilis* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1961-4.
145. Johansson Å, Nagy E, Sóki J. Instant screening and verification of carbapenemase activity in *Bacteroides fragilis* in positive blood culture, using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology*. 2014;63(8):1105-10.
146. Cordovana M, Kostrzewa M, Sóki J, Witt E, Ambretti S, Pranada AB. *Bacteroides fragilis*: A whole MALDI-based workflow from identification to

confirmation of carbapenemase production for routine laboratories. *Anaerobe*. 2018;54:246-53.

147. Toprak NU, Akgul O, Söki J, Soyletir G, Nagy E. Detection of beta-lactamase production in clinical *Prevotella* species by MALDI-TOF MS method. *Anaerobe*. 2020;65:102240.

148. Justesen US, Acar Z, Sydenham TV, Johansson Å. Antimicrobial susceptibility testing of *Bacteroides fragilis* using the MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA). *Anaerobe*. 2018;54:236-9.

149. Ulger Toprak N, Veloo ACM, Urban E, Wybo I, Justesen US, Jean-Pierre H, et al. A multicenter survey of antimicrobial susceptibility of *Prevotella* species as determined by Etest methodology. *Anaerobe*. 2018;52:9-15.

150. Eberly AR, Wallace MA, Shannon S, Heitman AK, Schuetz AN, Burnham CD, et al. Development and Validation of a Novel Anaerobic Carbapenem Inactivation Method (Ana-CIM) for the Detection of Carbapenemase Production in *Bacteroides fragilis*. *J Clin Microbiol*. 2022;60(4):e0218821.

151. Nicolau-Guillaumet N, Muggeo A, Moussalih S, de Champs C, Lozniewski A, Alauzet C, et al. An upgraded version of carbapenem inactivation method to detect *Bacteroides fragilis* carbapenemase. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2023;105(2):115857.

152. Schwensen SA, Acar Z, Sydenham TV, Johansson ÅC, Justesen US. Phenotypic detection of the *cfiA* metallo- β -lactamase in *Bacteroides fragilis* with the meropenem-EDTA double-ended Etest and the ROSCO KPC/MBL Confirm Kit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;72(2):437-40.

153. Bogaerts P, Engelhardt A, Berhin C, Bylund L, Ho P, Yusof A, et al. Evaluation of a new meropenem-EDTA double-ended Etest strip for the detection of the *cfiA* metallo-beta-lactamase gene in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(10):973-7.

154. Ho P-L, Yau C-Y, Ho L-Y, Chen JHK, Lai ELY, Lo SWU, et al. Rapid detection of *cfiA* metallo- β -lactamase-producing *Bacteroides fragilis* by the combination of MALDI-TOF MS and CarbaNP. *Journal of Clinical Pathology*. 2017;70(10):868-73.

155. Kierzkowska M, Majewska A, Karłowicz K, Pituch H. Phenotypic and genotypic identification of carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis* clinical strains. *Med Microbiol Immunol*. 2023.

156. Akyar I, Ayas M, Karatuna O, Besli Y. Evaluation of the Carba NP Test for the Detection of Carbapenemase Activity in Species. *Polish Journal of Microbiology*. 2018;67(1):97-101.

157. FDA. Antibacterial Susceptibility Test Interpretive Criteria. 2023.

158. Baaity Z, von Loewenich FD, Nagy E, Orosz L, Burián K, Somogyvári F, et al. Phenotypic and Molecular Characterization of Carbapenem-Heteroresistant *Bacteroides fragilis* Strains. *Antibiotics*. 2022;11(5):590.

159. Soki J, Gonzalez SM, Urban E, Nagy E, Ayala JA. Molecular analysis of the effector mechanisms of cefoxitin resistance among *Bacteroides* strains. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(11):2492-500.

160. Jamal W, Khodakhast FB, AlAzmi A, Somicronki J, AlHashem G, Rotimi VO. Prevalence and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic extra-intestinal *Bacteroides fragilis* among 13-year collection of isolates in Kuwait. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):14.

161. Trinh S, Reyssset G. Detection by PCR of the *nim* genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. *J Clin Microbiol*. 1996;34(9):2078-84.
162. Sóki J, Fodor E, Hecht DW, Edwards R, Rotimi VO, Kerekes I, et al. Molecular characterization of imipenem-resistant, *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. *J Med Microbiol*. 2004;53(Pt 5):413-9.
163. Sárvári KP, Sóki J, Iván M, Miszti C, Latkóczy K, Melegh SZ, et al. Detection of enterotoxin and protease genes among Hungarian clinical *Bacteroides fragilis* isolates. *Anaerobe*. 2017;48:98-102.
164. Kuzucu C, Durmaz R, Otlu B, Aktas E, Gulcan H, Cizmeci Z. Species distribution, antifungal susceptibility and clonal relatedness of *Candida* isolates from patients in neonatal and pediatric intensive care units at a medical center in Turkey. *New Microbiologica*. 2008;31(3):401-8.
165. Zafar H, Saier MH, Jr. Gut *Bacteroides* species in health and disease. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1-20.
166. De Keukeleire S, Wybo I, Naessens A, Echahidi F, Van der Beken M, Vandoorslaer K, et al. Anaerobic bacteraemia: a 10-year retrospective epidemiological survey. *Anaerobe*. 2016;39:54-9.
167. Lassmann B, Gustafson DR, Wood CM, Rosenblatt JE. Reemergence of Anaerobic Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;44(7):895-900.
168. Vena A, Muñoz P, Alcalá L, Fernandez-Cruz A, Sanchez C, Valerio M, et al. Are incidence and epidemiology of anaerobic bacteremia really changing? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015;34(8):1621-9.
169. Dubreuil L, Veloo AC, Sóki J. Correlation between antibiotic resistance and clinical outcome of anaerobic infections; mini-review. *Anaerobe*. 2021;72:102463.
170. Cooley L, Teng J. Anaerobic resistance: should we be worried? *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(6):523-30.
171. Copsey-Mawer S, Hughes H, Scotford S, Anderson B, Davis C, Perry MD, et al. UK *Bacteroides* species surveillance survey: Change in antimicrobial resistance over 16 years (2000-2016). *Anaerobe*. 2021;72:102447.
172. Forbes JD, Kus JV, Patel SN. Antimicrobial susceptibility profiles of invasive isolates of anaerobic bacteria from a large Canadian reference laboratory: 2012–2019. *Anaerobe*. 2021;70:102386.
173. Veloo ACM, Tokman HB, Jean-Pierre H, Dumont Y, Jeverica S, Lienhard R, et al. Antimicrobial susceptibility profiles of anaerobic bacteria, isolated from human clinical specimens, within different European and surrounding countries. A joint ESGAI study. *Anaerobe*. 2020;61:102111.
174. Wang Y, Han Y, Shen H, Lv Y, Zheng W, Wang J. Higher Prevalence of Multi-Antimicrobial Resistant *Bacteroides* spp. Strains Isolated at a Tertiary Teaching Hospital in China. *Infect Drug Resist*. 2020;13:1537-46.
175. Ueda T, Takesue Y, Matsumoto T, Tateda K, Kusachi S, Mikamo H, et al. Change in antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from surgical site infections over the past decade in Japanese nation-wide surveillance study. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2021;27(7):931-9.
176. Ulger N, Celik C, Cakici O, Soyletir G. Antimicrobial susceptibilities of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* strains isolated from clinical specimens and human intestinal microbiota. *Anaerobe*. 2004;10(5):255-9.

177. Doğan M, Baysal B. [Identification of anaerobic bacteria isolated from various clinical specimens and determination of antibiotic susceptibilities]. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(2):211-9.
178. Kangaba AA, Sağlam FY, Tokman HB, Torun M, Torun MM. The prevalence of enterotoxin and antibiotic resistance genes in clinical and intestinal *Bacteroides fragilis* group isolates in Turkey. *Anaerobe.* 2015;35(Pt B):72-6.
179. Eminoglu S TB, Sayın E, Ülger Toprak N. Ağarda dilüsyon ve deneme aşamasındaki EUCAST disk difüzyon yöntemi ile saptanan *Bacteroides fragilis* grubu izolatlarına ait antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2021;51(2):109-18.
180. Gao Q, Wu S, Xu T, Zhao X, Huang H, Hu F. Emergence of carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis* in China. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2019;53(6):859-63.
181. Yekani M, Rezaee MA, Beheshtirouy S, Baghi HB, Bazmani A, Farzinazar A, et al. Carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis*: A review of molecular mechanisms. *Anaerobe.* 2022;76:102606.
182. Toprak Ülger N, İlki A, Özel N, Balkan N, Söyletir G. [Can meropenem E-test be used to estimate the presence of carbapenem resistance gene *cfiA* among *Bacteroides fragilis* strains?]. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45(3):385-91.
183. Litterio MR, Cejas D, Gutkind G, Radice M. Identification of *CfiA* coding genes in *Bacteroides fragilis* isolates recovered in Argentina. Inconsistencies in *CfiA* organization and nomenclature. *Anaerobe.* 2017;48:257-61.
184. Söki J, Edwards R, Hedberg M, Fang H, Nagy E, Nord CE. Examination of *cfiA*-mediated carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis* strains from a European antibiotic susceptibility survey. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2006;28(6):497-502.
185. Jha L, Y BL, Ragupathi NKD, Veeraraghavan B, Prakash JAJ. Phenotypic and Genotypic Correlation of Antimicrobial Susceptibility of *Bacteroides fragilis*: Lessons Learnt. *Cureus.* 2023;15(3):e36268.
186. Rong SMM, Rodloff AC, Stingu C-S. Diversity of antimicrobial resistance genes in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains isolated in Germany. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 2021;24:328-34.
187. Hashimoto T, Hashinaga K, Komiya K, Hiramatsu K. Prevalence of antimicrobial resistant genes in *Bacteroides* spp. isolated in Oita Prefecture, Japan. *J Infect Chemother.* 2023;29(3):284-8.
188. Tekeş B ES, Sayın E, Ülger Toprak N. *Bacteroides fragilis* grubu izolatların klindamisin, tetrasiklin ve tigesikline duyarlılıkları ve dirençten sorumlu *tet* ve *ermF* genlerini barındırma durumları. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2021;51(1):23-32.
189. Smith CJ, Tribble GD, Bayley DP. Genetic elements of *Bacteroides* species: a moving story. *Plasmid.* 1998;40(1):12-29.
190. Wang Y, Wang GR, Shelby A, Shoemaker NB, Salyers AA. A newly discovered *Bacteroides* conjugative transposon, CTnGERM1, contains genes also found in gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(8):4595-603.
191. Speer BS, Bedzyk L, Salyers AA. Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. *J Bacteriol.* 1991;173(1):176-83.

192. Nagy E, Dowzicky MJ. In vitro activity of tigecycline and comparators against a European compilation of anaerobes collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST). *Scand J Infect Dis*. 2010;42(1):33-8.
193. Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT. Comparative in vitro susceptibilities of 396 unusual anaerobic strains to tigecycline and eight other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(10):3507-13.
194. Nagy E, Urbán E, Nord CE. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(3):371-9.
195. Jahan L, Biswas R. Molecular study on metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis* group isolates from a South Indian tertiary care center. *Anaerobe*. 2023;80.
196. Shafquat Y, Jabeen K, Farooqi J, Mehmood K, Irfan S, Hasan R, et al. Antimicrobial susceptibility against metronidazole and carbapenem in clinical anaerobic isolates from Pakistan. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2019;8(1):99.
197. Sheikh SO, Jabeen K, Qaiser S, Ahsan ST, Khan E, Zafar A. High rate of non-susceptibility to metronidazole and clindamycin in anaerobic isolates: Data from a clinical laboratory from Karachi, Pakistan. *Anaerobe*. 2015;33:132-6.
198. Sadarangani SP, Cunningham SA, Jeraldo PR, Wilson JW, Khare R, Patel R. Metronidazole- and carbapenem-resistant *bacteroides thetaiotaomicron* isolated in Rochester, Minnesota, in 2014. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(7):4157-61.
199. Dingsdag SA, Hunter N. Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(2):265-79.
200. Mahmood B, Juhász H, Leitsch D, Sóki J. The effects of identical nim gene-insertion sequence combinations on the expression of the nim genes and metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis* strains. *Anaerobe*. 2023:102739.
201. Toprak Ülger N, Sayın E, Soyad A, Dane F, Söyletir G. [The first metronidazole-resistant *Bacteroides* species isolated at Marmara University Hospital: *Bacteroides thetaiotaomicron*]. *Mikrobiyol Bul*. 2013;47(4):717-21.
202. Husain F, Veeranagouda Y, Hsi J, Meggersee R, Abratt V, Wexler HM. Two multidrug-resistant clinical isolates of *Bacteroides fragilis* carry a novel metronidazole resistance nim gene (nimJ). *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(8):3767-74.
203. Szöke I, Dósa E, Nagy E. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Hungary. *Anaerobe*. 1997;3(2):87-9.
204. Ülger N, Rajendram D, Yagci A, Gharbia S, Shah HN, Gulluoglu BM, et al. The distribution of the bft alleles among enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from stool specimens and extraintestinal sites. *Anaerobe*. 2006;12(2):71-4.
205. Mundy LM, Sears CL. Detection of Toxin Production by *Bacteroides fragilis*: Assay Development and Screening of Extraintestinal Clinical Isolates. *Clinical Infectious Diseases*. 1996;23(2):269-76.
206. Claros MC, Claros ZC, Tang YJ, Cohen SH, Silva J, Jr., Goldstein EJ, et al. Occurrence of *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene-carrying strains in Germany and the United States. *J Clin Microbiol*. 2000;38(5):1996-7.
207. Chung GT, Franco AA, Wu S, Rhie GE, Cheng R, Oh HB, et al. Identification of a third metalloprotease toxin gene in extraintestinal isolates of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun*. 1999;67(9):4945-9.

208. Kato N, Kato H, Watanabe K, Ueno K. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with bacteremia. Clin Infect Dis. 1996;23 Suppl 1:S83-6.
209. Kierzkowska M, Majewska A, Szymanek-Majchrzak K, Sawicka-Grzelak A, Mlynarczyk A, Mlynarczyk G. The presence of antibiotic resistance genes and bft genes as well as antibiotic susceptibility testing of *Bacteroides fragilis* strains isolated from inpatients of the Infant Jesus Teaching Hospital, Warsaw during 2007-2012. Anaerobe. 2019;56:109-15.
210. Kleivdal H, Hofstad T. Chromosomal restriction endonuclease analysis and ribotyping of *Bacteroides fragilis*. APMIS. 1995;103(1-6):180-4.
211. Khodaei N, Sadeghi Kalani B, Zamani M, Mohammadzadeh R, Talebi M, Narimani T, et al. Evaluation of the genetic relatedness of *Bacteroides fragilis* isolates by TRs analysis. Iran J Basic Med Sci. 2020;23(10):1323-7.
212. Vallim DC, Oliveira ICM, Antunes ENF, Ferreira EO, Moraes SR, Paula GR, et al. Evaluation of Genetic Relatedness of *Bacteroides fragilis* Strains Isolated from Different Sources by AP-PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Assays. Anaerobe. 2002;8(4):192-9.
213. Martirosian G, van Belkum A, van Leeuwen W, Meisel-Mikolajczyk F, Verbrugh H. PCR ribotyping and arbitrarily primed PCR for the comparison of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from two Polish university hospitals. Clinical Microbiology and Infection. 1997;3(1):102-8.
214. Meisel-Mikolajczyk F, Zawidzka E, Solarz K, Leszczyński P, Rokosz A, Klos W, et al. A comparative study of enterotoxin-producing *Bacteroides fragilis* strains isolated in Poland. Clinical Infectious Diseases. 1997;25(2 SUPPL.):S151-S2.
215. Moraes SR, Gonçalves RB, Mouton C, Seldin L, Ferreira MCdS, Cavalcanti Pilotto Domingues RM. *Bacteroides fragilis* isolates compared by AP-PCR. Research in Microbiology. 1999;150(4):257-63.
216. Sarma PN, Tang YJ, Prindiville TP, Osborne PD, Jang S, Silva J, et al. Genotyping of *Bacteroides fragilis* isolates from stool specimens by arbitrarily-primed-PCR. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2000;37(4):225-9.
217. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol. 1999;37(6):1661-9.
218. Nielsen FD, Skov MN, Sydenham TV, Justesen US. Development and Clinical Application of a Multilocus Sequence Typing Scheme for *Bacteroides fragilis* Based on Whole-Genome Sequencing Data. Microbiol Spectr. 2023;11(2):e0511122.