

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KLİNİK ÖRNEKLERDE ANAEROB ENFEKSİYON
ETKENLERİNİN TANIMLANMASI İÇİN MULTİPLEX PCR
PANELİ GELİŞTİRİLMESİ**

**Hazırlayan
Mehmet ÖLÇÜ**

**Danışmanlar
Prof. Dr. Duygu PERÇİN RENDERS (Danışman)
Doç. Dr. Mustafa Altay ATALAY (2. Danışman)**

Doktora Tezi

**Eylül 2019
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KLİNİK ÖRNEKLERDE ANAEROB ENFEKSİYON
ETKENLERİNİN TANIMLANMASI İÇİN MULTİPLEX PCR
PANELİ GELİŞTİRİLMESİ**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Mehmet ÖLÇÜ**

Danışmanlar

Prof. Dr. Duygu PERÇİN RENDERS (Danışman)

Doç. Dr. Mustafa Altay ATALAY (2. Danışman)

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2017-7697 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Eylül 2019

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

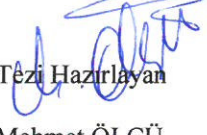
Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı : Mehmet ÖLÇÜ

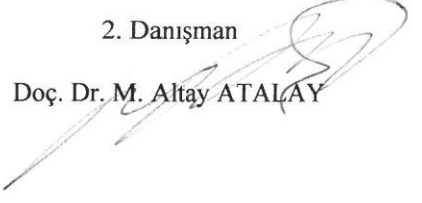
İmza :

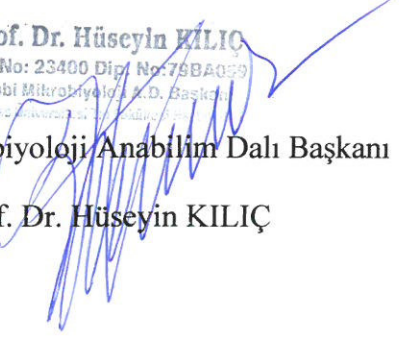
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Klinik Örneklerde Anaerob Enfeksiyon Etkenlerinin Tanımlanması için Multiplex PCR Paneli Geliştirilmesi” adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.


Tezi Hazırlayan
Mehmet ÖLÇÜ


Danışman
Prof. Dr. Duygu PERÇİN RENDERS


2. Danışman
Doç. Dr. M. Altay ATALAY


Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ
İht. No: 23400 Dipl. No: 798A059
Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. Başkanı
Erciyes Üniversitesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Duygu PERÇİN RENDERS ve **Doç. Dr. Mustafa Altay ATALAY** danışmanlığında **Mehmet ÖLÇÜ** tarafından hazırlanan “**Klinik Örneklerde Anaerob Enfeksiyon Etkenlerinin Tanımlanması için Multiplex PCR Paneli Geliştirilmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

20.09 / 2019

JÜRİ:

İMZA

Danışman : Prof. Dr. Duygu PERÇİN RENDERS



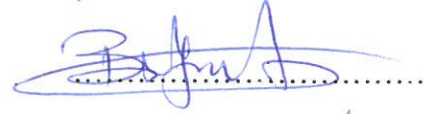
(Kütahya Sağlık Bilimleri Ünv. Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.)

Üye : Doç. Dr. Mustafa Altay ATALAY



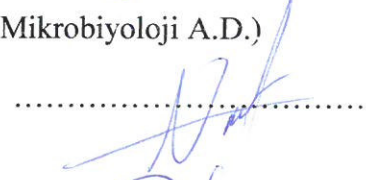
(Erciyes Ünv. Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.)

Üye : Prof. Dr. Bilgehan AYGİN



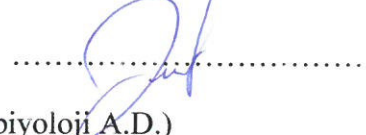
(Erciyes Ünv. Tıp Fak. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.)

Üye : Prof. Dr. Ayşe Nedret KOÇ



(Erciyes Ünv. Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Filiz ORAK



(Kahramanmaraş Sütçü İmam Ünv. Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.../.../...

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez çalışmam boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocalarım ve tez danışmanlarım sayın Prof. Dr. Duygu PERÇİN RENDERS ve sayın Doç. Dr. Mustafa Altay ATALAY'a, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Ayşe Nedret KOÇ ve Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU'na;

Doktora öğrenimim boyunca yetişmemde büyük emekleri olan ERÜ Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ ve anabilim dalımızın değerli hocalarına;

Çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli laboratuvar ortamını sağlayan ve laboratuvar çalışmalarım sırasındaki dostluk ve yardımlarına minnettar olduğum ERÜ Genom ve Kök Hücre Merkezi yönetimine ve çalışanlarına, ERÜ Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Bakteriyoloji Laboratuvarı çalışanlarına, ERÜ Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı çalışanlarına, Arş. Gör. Emrah ERDOĞAN ve Arş. Gör. Merve YÜRÜK'e;

Bugünlere gelmem için fedakârlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen her zaman yanımda olduklarını hissettiren sevgili anneme, babama ve kardeşlerime, bu zorlu süreçte ve her konuda sabırla, vefa ile beni destekleyen, her zaman yanımda olan çok kıymetli canım eşime ve sevgili oğluma teşekkür ederim.

Mehmet ÖLÇÜ

KLİNİK ÖRNEKLERDE ANAEROB ENFEKSİYON ETKENLERİNİN TANIMLANMASI İÇİN MULTİPLEX PCR PANELİ GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet ÖLÇÜ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Eylül 2019

Danışmanlar: Prof. Dr. Duygu PERÇİN RENDERS, Doç. Dr. M. Altay ATALAY

ÖZET

Anaerob bakteriler çok çeşitli ciddi enfeksiyonların önemli etkenlerinden olmakla birlikte izolasyon ve tanımlamadaki güçlükler nedeniyle enfeksiyon etiyojisinde sıklıkla göz ardı edilmektedirler. Bu çalışma anaerob enfeksiyonlardan en sık izole edilen *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* ve *Actinomyces* bakterilerini aynı anda çeşitli klinik örneklerden cins düzeyinde tanımlayabilecek yeni bir multiplex PCR panelinin geliştirilmesi amacıyla yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen anaerob bakterileri tanımlamak için her bir cinse özgü 16S rRNA genini hedef alan yeni bir multiplex PCR anaerob tanımlama testi geliştirildi ve optimize edildi. Çalışmada tasarlanan multiplex PCR testinin özgüllüğü ve analitik duyarlılığı çalışmaya dahil edilen pozitif ve negatif standart bakteri suşları üzerinde çalışılarak belirlendi.

Çalışmada anaerob enfeksiyon şüphesiyle laboratuvara gönderilen 46 klinik örneğin aerob ve anaerob kültürü yapıldı. Anaerob kültürden izole edilen anaerob bakteriler, konvansiyonel yöntemler ve VITEK 2 otomatize tanımlama sistemi kullanılarak tanımlandı. Aynı örneklerden DNA izolasyonu yapılarak çalışmada geliştirilen multiplex PCR testi ile anaerob bakteri tanımlaması yapıldı. Daha sonra multiplex PCR sonuçları ile rutin laboratuvar sonuçları karşılaştırıldı.

Geliştirilen panel ile tüm pozitif kontrol suşları hem tek tek hem de toplu olarak test edilmiş ve tanımlayıcı bantların olduğu gözlenmiştir. Multiplex PCR testinin analitik duyarlılığı bakteri cinsine göre değişmekle birlikte $1-10^3$ CFU/ml aralığında bulunmuştur.

Çalışmamızda 46 klinik örneğin 8'inde (%17,4) anaerob üreme olmuş ve bunlardan konvansiyonel yöntemler ve VITEK 2 otomatize tanımlama sistemi kullanılarak 9

anaerob bakteri tanımlanmıştır. Geliştirilen multiplex PCR testi ile ise 46 klinik örneğin 20'sinden (%43,5) 35 anaerob bakteri cins düzeyinde tanımlanmıştır. Anaerob kültüründe üreme olan 8 örneğin 5'i (%62,5) multiplex PCR test sonucu ile uyumlu çıkarken 3'ü (%37,5) uyumsuz çıkmıştır. Multiplex PCR testi ile klinik örneklerden en sık izole edilen anaeroblar *Prevotella* spp. (%37,1) ve *Fusobacterium* spp. (%22,9) cinsleri olurken bunları sırasıyla *Clostridium* spp. (%14,3), *Peptostreptococcus* spp. (%11,4), *Bacteroides* spp. (%8,6) ve *Veillonella* spp. (%5,7) cinsleri izlemiştir. Anaerob kültür sonucu referans yöntem olarak alındığında multiplex PCR testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %75, %63,2, %30 ve %92,3 bulunmuştur.

Sonuç olarak, Çalışmamızda geliştirilen multiplex PCR paneli ile anaerobların kültüre dayalı tanımlanmalarındaki olumsuzluklar giderilerek, klinik örneklerden kısa sürede daha doğru anaerob bakteri tanımlaması yapılabileceği ve enfeksiyonların daha doğru bir şekilde tedavi edilebilmesine olanak sağlayacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Anaerob bakteri tanımlama, Anaerob enfeksiyon tanısı, Multiplex PCR

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR PANEL FOR IDENTIFICATION OF ANAEROBIC INFECTIOUS AGENTS IN CLINICAL SAMPLES

Mehmet ÖLÇÜ

Erciyes University, Institute of Medical Sciences

Department of Medical Microbiology PhD Thesis

September 2019

Supervisors: Prof. Dr. Duygu PERÇİN RENDERS, Doç. Dr. M. Altay ATALAY

ABSTRACT

Although anaerobic bacteria are important agents of a wide variety of serious infections, they are often overlooked in the etiology of infection due to difficulties in isolation and identification. The aim of this study was to develop a new multiplex PCR panel that can identify *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* and *Actinomyces* bacteria at the genus level which are most frequently isolated from anaerobic infections.

A new multiplex PCR panel for identification of anaerobic bacteria was developed by using genus specific 16S rRNA gene of each bacteria included in the study and the test was optimized. The specificity and analytical sensitivity of the multiplex PCR assay designed in the study were determined by using the positive and negative standard strains.

Aerobic and anaerobic cultures of 46 clinical specimens which were sent to the laboratory with suspicion of anaerobic infection were performed. Anaerobic bacteria were identified using conventional methods and VITEK 2 automated identification system. DNA isolation was performed from the same samples and anaerobic bacteria were identified by multiplex PCR test developed in the study. Multiplex PCR results and routine laboratory results were compared.

All positive control strains were tested individually and collectively by using the developed panel and it was observed that descriptive bands were formed in all tests. The analytical sensitivity of the Multiplex PCR assay was found to be 10^3 CFU / ml, depending on the bacterial species.

In our study, eight (17.4%) of 46 clinical specimens had anaerobic growth and nine anaerobic bacteria were identified using conventional methods and VITEK 2 automated identification system. Multiplex PCR test identified 35 anaerobic bacteria from 20

(43.5%) of 46 clinical samples. Five (62.5%) of the eight samples which had anaerobic growth in anaerobe culture were compatible with the multiplex PCR test and three (37.5%) were incompatible. The most common anaerobes isolated from clinical specimens by Multiplex PCR assay were *Prevotella* spp. (37.1%) and *Fusobacterium* spp. (22.9%) while *Clostridium* spp. (14.3%), *Peptostreptococcus* spp. (11.4%), *Bacteroides* spp. (8.6%) and *Veillonella* spp. (5.7%) followed these genera. When anaerobic culture was accepted as the reference method, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of the multiplex PCR test were 75%, 63.2%, 30% and 92.3%, respectively.

As a result, we concluded that the multiplex PCR panel developed in our study eliminates the problems in the identification of anaerobes based on culture and provides more accurate anaerobic bacteria identification from clinical specimens in a short period of time and allows more accurate infection treatment.

Keywords: Anaerobic bacteria identification, Anaerobic infection diagnosis, Multiplex PCR

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xiii
TABLolar LİSTESİ	xiv
RESİMLER LİSTESİ	xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xvii
GRAFİKLER LİSTESİ.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Anaerob Bakterilerin Tarihçesi.....	3
2.2. Anaerob Bakterilerin Tanımı ve Bakteri Oksijen İlişkisi	4
2.3. Anaerobların Yaşam Koşulları	6
2.4. Normal Floradaki Anaerobların Önemi ve Dağılımı	8
2.5. Anaerob Bakterilerin Patojenitesi ve Virülans Faktörleri.....	10
2.6. Klinik Örneklerden Elde Edilen Anaerob Bakteriler ve Sınıflandırma	13
2.7. Anaerob Bakterilerden Kaynaklanan Enfeksiyonlar	15
2.8. <i>Bacteroides</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	18
2.9. <i>Prevotella</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	20
2.10. <i>Fusobacterium</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	22
2.11. <i>Veillonella</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	24

2.12. <i>Peptostreptococcus</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	25
2.13. <i>Clostridium</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	26
2.14. <i>Actinomyces</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	29
2.15. Anaerob Kültür için Klinik Örneklerin Toplanması, Nakli ve İşlenmesi	31
2.15.1. Örneklerin Toplanması	31
2.15.2. Örneklerin Nakli	31
2.15.3. Anaerobik Kültür için Örneklerin İşlenmesi	33
2.15.3.1. Makroskopik İnceleme	33
2.15.3.2. Örneğin Hazırlanması	33
2.15.3.3. Gram Yöntemiyle Boyama	33
2.16. Besiyeri Seçimi	34
2.17. Besiyerine İnokülasyon.....	36
2.18. Anaerob Bakterilerin İnkübasyon Şartları ve İnkübasyon Sistemleri.....	36
2.18.1. Anaerobik Kabinler.....	37
2.18.2. Anaerobik Poşetler.....	37
2.18.3. Anaerobik Kavanozlar	37
2.18.4. Anoxomat Mark II Sistemi	37
2.19. İlk Kültürlerin Anaerob Bakteriler Yönünden İncelenmesi.....	38
2.20. Anaerobların İdentifikasyonunda Kullanılan Konvansiyonel Basit Testler	39
2.20.1. Aerotolerans Testi.....	39
2.20.2. Özel Potensli Antimikrobiyal Diskler.....	39
2.20.3. Spot İndol Testi.....	41
2.20.4. Nitrat Redüksiyon Testi	41
2.20.5. Katalaz Testi	41
2.20.6. SPS (Sodyum Polianetol Sulfonat) Diski (1mg).....	41
2.20.7. Safra Testi	41

2.20.8. Floresans Testi	41
2.20.9. Lesitinaz, Lipaz ve Proteolitik Enzim Reaksiyonları	42
2.20.10. Üreaz Testi.....	42
2.21. Yarı ve Tam Otomatize Sistemlerle İdentifikasyon.....	42
2.22. Anaerob Bakterileri Tanımlamada Kullanılan Diğer Yöntemler.....	43
2.22.1. MASS Spektrometri (MS) Sistemleri ile İdentifikasyon.....	43
2.22.2. Gaz Kromatografisi Yöntemi ile İdentifikasyon	44
2.23. Anaerobların Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	46
3.1. Standart Bakteri Suşlarının Canlandırılması.....	50
3.1.1. Schaedler Sıvı Besiyerinin Hazırlanılması	50
3.1.2. Eküvyon Tarzında Sunulan Liyofilize Standart Suşları Canlandırma Yöntemi	50
3.1.3. Cam Ampul İçinde Sunulan Liyofilize Standart Suşları Canlandırma Yöntemi	51
3.2. Standart Bakteri Suşlarının Stoklanması ve Stoktan Canlandırılması.....	52
3.3. Bakteri Kültürlerinden ve Hasta Örneklerinden Total Genomik DNA İzolasyonu	52
3.3.1. Gram Negatif Bakterilerden Total Genomik DNA İzolasyonu Protokolü	52
3.3.2. Gram Pozitif Bakterilerden Total Genomik DNA İzolasyonu Protokolü..	54
3.3.3. Kan ve Vücut Sıvısından Total Genomik DNA İzolasyonu Protokolü	54
3.3.4. Doku ve Apseden Total Genomik DNA İzolasyonu Protokolü	55
3.3.5. Eküvyonlu Taşıma Besiyeri ile Gelen Örneklerden Total Genomik DNA İzolasyonu Protokolü	55
3.4. Primer DNA Dizilerinin Tasarımı	56
3.5. Primer DNA Dizilerinin Özgüllüklerinin Belirlenmesi.....	57
3.6. Multiplex PCR Reaksiyon Karışımı	57
3.7. Multiplex PCR Thermal Cycler Cihazı Çalışma Protokolü.....	59

3.8. Multiplex PCR'in Analitik Duyarlılığının Belirlenmesi	60
3.9. Agaroze Jel Elektroforez Yöntemiyle PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi	60
3.9.1. Elektroforez Tampon Solüsyonunun Hazırlanması	60
3.9.2. Agaroze Jelin Hazırlanması	61
3.9.3. PCR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi	61
3.9.4. PCR Ürünlerinin Agaroze Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi	61
3.10. Hasta Örneklerinin Geleneksel Mikrobiyolojik Yöntemlerle İşleme Alınması	62
3.10.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	62
3.10.2. Örneklerin Ön İnceleme İşlemleri	62
3.10.3. Kültür	62
3.10.4. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması	63
4. BULGULAR	65
4.1. DNA Ölçüm Sonuçları	65
4.2. Multiplex PCR Yöntemiyle Primer DNA Dizilerinin Doğrulanması ve Özgüllüklerinin Belirlenmesi	66
4.3. Multiplex PCR Analitik Duyarlılık Sonuçları	68
4.4. Hasta Örneklerinde Anaerob Bakterilerin Tanımlanması	73
4.5. Geleneksel Mikrobiyolojik Yöntemler ile Multiplex PCR Panelinin Karşılaştırılması	81
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	87
6. KAYNAKLAR	103

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	: American Type of Culture Collection
ATP	: Adenozin trifosfat
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
CAMP	: Christie, Atkins ve Munch-Petersen
CFU	: Colony Forming Unit
CO ₂	: Karbondioksit
dH ₂ O	: Deiyonize su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
ERÜ	: Erciyes Üniversitesi
g	: Gram
H ₂	: Hidrojen
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
N ₂	: Azot
O ₂	: Oksijen
°C	: Santigrat derece
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
UV	: Ultraviyole
xg	: Yer çekimi kuvveti

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Bakterilerin çeşitli moleküler oksijen konsantrasyonlarında üreyebilmelerine göre gruplandırılması	6
Tablo 2.2.	İnsan normal florasındaki aerob, anaerob bakteri sayıları ve predominant anaerobik bakteriler	9
Tablo 2.3.	Anaerob bakterilerin potansiyel virülans faktörleri.....	13
Tablo 2.4.	Anaerobik bakterilerin Gram boyama ve mikroskopik morfolojilerine göre sınıflandırılması.....	14
Tablo 2.5.	Klinik olarak önemli olan ve/veya klinik örneklerden en sık izole edilen anaerob bakteriler	15
Tablo 2.6.	Ekzojen ve endojen kaynaklı anaerob bakteri enfeksiyonları	16
Tablo 2.7.	Anaerobların yaygın olarak etken olduğu enfeksiyon tipleri ve pozitif kültür oranları	17
Tablo 2.8.	Anaerob kültür için uygun olan ve olmayan örnekler	32
Tablo 2.9.	Anaerob bakteri izolasyonunda kullanılan besiyerleri.	34
Tablo 2.10.	Anaerob bakterilerin koloni özelliklerine göre muhtemel tanısı	38
Tablo 2.11.	Anaerob bakterilerin identifikasyonunda kullanılan antibiyotik diskleri	39
Tablo 2.12.	Anaerobik bakterilerin floresans verme özellikleri	42
Tablo 2.13.	Otomatize ve yarı otomatize sistemler ve özellikleri	43
Tablo 3.1.	Çalışmada kullanılan cihazlar	47
Tablo 3.2.	Çalışmada kullanılan malzemeler.....	48
Tablo 3.3.	Çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrol DNA'ları.....	49
Tablo 3.4.	Çalışmada kullanılan primer DNA dizleri ve amplikon büyüklükleri. ...	56
Tablo 3.5.	Pozitif kontrol için multiplex PCR reaksiyon karışımı.	58
Tablo 3.6.	Her hasta örneği için multiplex PCR reaksiyon karışımı.	59
Tablo 3.7.	Thermal cycler cihazı multiplex PCR çalışma protokolü.....	59
Tablo 4.1.	Çalışmada kullanılan DNA'ların ölçüm sonuçları.....	65
Tablo 4.2.	Analitik duyarlılık çalışmasında kullanılan DNA'ların ölçüm sonuçları	69

Tablo 4.3.	Multiplex PCR paneli analitik duyarlılık sonuçları.....	69
Tablo 4.4.	Hasta örneklerinin taşınma şekilleri ve anaerob bakterilerin tanımlama sonuçları	76
Tablo 4.5.	Multiplex PCR paneli ile tanımlanan bakterilerin hasta örneklerine göre dağılımı.....	81
Tablo 4.6.	Gram boyama sonuçlarına göre multiplex PCR panelinin değerlerinin hesaplanması.....	81
Tablo 4.7.	Gram boyama sonuçları ile multiplex PCR panelinin sonuçlarının karşılaştırılması.....	82
Tablo 4.8.	Anaerob kültür sonuçlarına göre multiplex PCR panelinin değerlerinin hesaplanması.....	83
Tablo 4.9.	Anaerob kültür sonuçları ile multiplex PCR panelinin sonuçlarının karşılaştırılması.....	84

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1.	<i>Bacteroides</i> cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri	19
Resim 2.2.	<i>Prevotella</i> cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri	21
Resim 2.3.	<i>Fusobacterium</i> cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri	23
Resim 2.4.	<i>Veillonella</i> cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri	24
Resim 2.5.	<i>Peptostreptococcus</i> cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri	25
Resim 2.6.	<i>Clostridium</i> cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri	27
Resim 2.7.	<i>C. perfringens</i> ters CAMP ve çift zon hemoliz görünümü	28
Resim 2.8.	<i>Actinomyces</i> cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri	30
Resim 2.9.	Özel potensli antibiyotik disklerinin farklı bakterilerdeki görünümü	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.	Pozitif kontrol DNA'ları ile yapılan multiplex PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde görünümü.....	66
Şekil 4.2.	Negatif kontrol DNA'ları ile yapılan multiplex PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde görünümü.....	67
Şekil 4.3.	<i>Bacteroides</i> ve <i>Prevotella</i> cinslerinin PCR bandlarının karşılaştırılması.....	68
Şekil 4.4.	<i>Fusobacterium</i> spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	70
Şekil 4.5.	<i>Veillonella</i> spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü..	70
Şekil 4.6.	<i>Actinomyces</i> spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü	71
Şekil 4.7.	<i>Bacteroides</i> spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	71
Şekil 4.8.	<i>Prevotella</i> spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü ..	72
Şekil 4.9.	<i>Peptostreptococcus</i> spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü	72
Şekil 4.10.	<i>Clostridium</i> spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	73
Şekil 4.11.	1-10 no'lu hasta örneklerinin multiplex PCR çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	74
Şekil 4.12.	11-22 no'lu hasta örneklerinin multiplex PCR çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	74
Şekil 4.13.	23-34 no'lu hasta örneklerinin multiplex PCR çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	75
Şekil 4.14.	35-46 no'lu hasta örneklerinin multiplex PCR çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	75
Şekil 4.15.	ATCC 33270 <i>Parvimonas micra</i> kültürünün VITEK 2 sonuç raporu	85
Şekil 4.16.	ATCC 33270 <i>Parvimonas micra</i> kültürünün API 20A sonuç raporu	86

GRAFİKLER LİSTESİ

- Grafik 4.1.** Anaerob bakterilerin kültür ve multiplex PCR sonuçlarının örnek türüne göre dağılımı 79
- Grafik 4.2.** Anaerob bakterilerin kültür ve multiplex PCR sonuçlarının örneklerin taşınma şekillerine göre dağılımı..... 80



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Anaerob bakteri enfeksiyonlarının tanımlanması ilk olarak Hipokrat'ın M.Ö. 4'üncü yüzyılda tetanosu tanımlamasıyla başlamış ve günümüzde gelişen teknolojiyle birlikte bu alanda büyük ilerlemeler olmuştur. Doğada çok yaygın olan anaerob bakteriler, insanların üst solunum yolları, gastrointestinal ve ürogenital sistem mikrobiyotasının önemli bir kısmını oluştururlar. Normal şartlar altında konağa yaralı olan bu mikroorganizmalar, konak savunmasının bozulması, travma, doku harabiyeti ve mukozal bariyerin bütünlüğünün bozulması gibi durumlarda steril vücut bölgelerine ulaşarak endojen kaynaklı ciddi enfeksiyon ve zehirlenmelere neden olabilen fırsatçı patojenlerdir (Willis, 1989; Hentges, 1993; Külekçi ve Topcuoğlu, 2011; Brook, 2017).

Anaeroblar vücudun hemen hemen her organında veya dokusunda enfeksiyöz süreçlerde tek başlarına ya da diğer mikroorganizmalarla birlikte yer alabilirler. Anaeroblar çoğu klinik örnekten izole edilebilirler ancak anaerob enfeksiyonların mikrobiyolojik tanısı her zaman mümkün değildir (Fader, 2019). Kültürde üremeleri için özel cihaz ve ekipmanlara gereksinimleri olan bu bakterilerin klinik örneklerden izolasyonu ve tanımlanmaları oldukça güç ve zaman alıcı mikrobiyolojik çalışmaları gerektirir. Bu nedenle birçok rutin laboratuvarında anaerob bakterilere yönelik tanısal çalışmalar yapılamamaktadır. İzolasyon ve tanımlanmalarının zahmetli, zaman alıcı ve yüksek maliyetli olması nedeniyle anaeroblar, enfeksiyon etiyolojisinde sıklıkla göz ardı edilmektedirler (Song, 2005; Tunçkanat, 2008a).

Anaerob bakterilerin klinik örneklerden izolasyonu ve tanımlanması geleneksel mikrobiyolojik yöntemlerin yanı sıra MALDI-TOF MS ve moleküler biyolojik yöntemlerle de yapılabilmektedir. Anaerob bakterilerin kültüründeki düşük başarı oranı ve konvansiyonel yöntemlerle yapılan tanımlamalardaki yetersizlikler bu bakterilerin

moleküler yöntemler ile tanımlanmasını artırmış ve bu alana olan ilginin artmasını sağlamıştır (Song, 2005; Veloo ve ark., 2011).

Bu çalışmada amaç çeşitli klinik örneklerde direkt kullanılmak üzere anaerob enfeksiyonlardan en sık izole edilen, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* ve *Actinomyces* bakterilerini cins düzeyinde hızlı tanısını sağlayabilecek yeni bir multiplex PCR panelinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Aynı zamanda klinik örnekler üzerinde hem konvansiyonel hem de çalışmada geliştirilen multiplex PCR yöntemleri kullanılarak anaerob bakteri tanımlamalarının yapılması ve elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anaerob Bakterilerin Tarihçesi

50 yıldan uzun bir süredir devam eden jeokimyasal araştırmalar, ilk Dünya atmosferinin anaerobik özellikte olduğunu ortaya koymuştur. Günümüzden 2 milyar yıl önce atmosferde neredeyse hiç moleküler oksijen olmadığı tahmin edilmektedir. 3.5 milyar yıllık mikroorganizma fosilleri bulunduğundan, 1.5 milyar yıl boyunca Dünya üzerinde sadece anaerobik prokaryotların olduğu sonucuna varılmıştır. Atmosferde oksijen birikmeye başladıktan sonra anaerobların çoğunun öldüğü, bir kısmının ise anaerobik bölgelere çekilerek hayatta kaldığı ve bugünkü anaerobların atası olduğu tahmin edilmektedir (Gest, 2003).

Anaerob bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonların klinik olarak tanımlanması oldukça eskilere dayanmaktadır. Tetanozu ilk olarak M.Ö. 4'üncü yüzyılda Hipokrat daha sonra M.S. 2'inci yüzyılda Kapadokyalı Aretaeus tarif etmiştir. Antonie Van Leeuwenhoek 1680 yılında Londra Kraliyet Cemiyeti'ne yazdığı ünlü mektuplarında mikroskopta gördüğü canlıların havasız ortamda hareket ettiğini bildirmiştir. Louis Pasteur tarafından 1861 yılında havasız ortamda bazı mikroorganizmaların üretilmesiyle anaerobik mikrobiyolojinin temelleri atılmıştır. Etiyolojik olarak çeşitli insan hastalıklarına bağlı bir dizi anaerobik bakterinin keşfinin ardından, 19. yüzyılın sonunda patojenik Clostridia'nın çoğu, *Bacteroides* ve *Fusobacterium* türleri dahil olmak üzere sporsuz anaerobların bazıları keşfedilmiştir. Chabert 1850'de *B. anthracis*'i, Pasteur ve Joubert 1877'de *C. septicum*'u, Welch ve Nuttall 1892'de *C. perfringens*'i, Novy 1894'de *C. novyi*'i üretmiştir. Gram negatif anaerob basillerin önemli bir patojen olduğunu ilk olarak 1884'de Loeffler hayvanlarda daha sonra 1891'de ise Schmorl insanlarda göstermiştir. Anaerob bakteriyolojiye büyük katkıları olan Veillon ve Zuber 1890'da kötü kokulu cerahatlerde anaerob bakterilerin rolü olduğunu bildirmişlerdir. McIntosh ve Fildes tarafından 1916 yılında geliştirilen anaerobik kavanoz buluşu, anaerobik

bakterilerin izole edilmesini kolaylaştırmıştır. Meleney ve Altemeier 1930'lu yıllarda cerrahi ve yumuşak doku enfeksiyonlarında anaerob bakterilerin önemini vurgulamışlardır. 1960'larda anaerob kavanozlarının ticari olarak geliştirilmesiyle anaerobların izolasyonu nispeten kolaylaşmıştır. Yine aynı dönem içerisinde anaerobik bakterilerin taksonomik sınıflandırılması Virginia Politeknik Enstitüsü tarafından yapılmış ve Finegold tarafından anaerobik enfeksiyonlara karşı ilk ilaç tedavisi uygulanmaya başlanmıştır. 1970'lerde yapılan çalışmalar enfeksiyonlardan anaerobik bakterilerin identifikasyonuna ve tedavi için uygun antibiyotik kullanımına yönelik olmuştur. Anaerobik enfeksiyonların tedavisinde en sık klindamisin, metronidazol ve sefoksitin antibiyotikleri kullanılmıştır. Günümüzde yapılan çalışmalarda anaerobik enfeksiyonların görülme sıklığının artmakta olduğu ve tedavi için kullanılan antibiyotiklere anaerobların direncinin arttığı belirtilmektedir (Willis, 1989; Gest, 2003; Bartlett, 2004; Lassmann ve ark., 2007; Garrett ve Onderdonk, 2015).

Günümüzde gelişen teknolojiyle birlikte, anaerob bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması geleneksel yöntemlerle birlikte moleküler yöntemlerinde kullanımıyla daha da kolaylaşmış ve bu gelişmeler bu alana olan ilginin artmasını sağlamıştır.

2.2. Anaerob Bakterilerin Tanımı ve Bakteri Oksijen İlişkisi

Bazı bakteriler aerobik solunum yoluyla 1 mol glikozdan 38 ATP veya Krebs / Sitrik Asit döngüsü ile 15 ATP sentezleyerek enerji elde etmektedir. Bu reaksiyonlar sırasında hücrede, sitokromlar, flavinler ve demirli bileşikler kullanılmaktadır. Bu bakterilerin son elektron alıcısı oksijendir. Bu tür bakterilere aerob bakteriler denir. Bazı bakteriler ise fermentatif metabolizmayı kullanarak 1 mol glikozdan 2 ATP elde ederler. Bu tür bakterilerin son elektron alıcısı ise inorganik azotlu bileşikler (nitrat, sülfat gibi) olabileceği gibi, organik bileşiklerde (fumarat, siyanür, karbonmonoksit, karbondioksit, polihidrik alkol gibi) olabilmektedir. Bu bakteriler oksijene gereksinim duymadıkları gibi ortamdaki oksijen varlığı bu bakterilere zarar vermektedir. Bu tür bakterilere anaerobik bakteriler denmektedir (Aydın, 2004). Anaerob bakteri, üreme ve metabolizmaları için oksijen kullanmayan, ancak enerjilerini fermentasyon tepkimelerinden sağlayan bakterilerdir. Anaeroblar için işlevsel bir tanımlama, bu bakterilerin üremeleri için düşük oksijen basıncına gereksinim duymaları ve normal atmosfer koşullarında %10 CO₂ varlığında katı besiyeri yüzeyinde üreyememeleri şeklinde yapılabilir (Carroll ve Hobden, 2016).

Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında, bakteriler oksijen ya da karbondioksit ile ilişkilerine göre sınıflandırılır. Bu sınıflandırma bakterilerin seçici olmayan genel üretim besiyerinde dört farklı ortamda üreyebilmelerine göre yapılabilir; Hava (ortalama %21 O₂), Karbondioksitli ortam (%15 O₂), Mikroaerofil ortam (%3-10 O₂), Anaerob ortam (%0 O₂). Bu sınıflandırma yöntemiyle bakteriler altı grup halinde sınıflandırılabilir (Tablo 2.1) (Külekçi ve Topcuoğlu, 2011).

- 1) **Zorunlu aerob:** Üremeleri için %15-21 O₂'ye ihtiyacı olan bakterilerdir (Ör. *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp.). Aerob bakteriler enerjilerini moleküler oksijenin oksitleyici ajan ve son elektron alıcısı olduğu “aerobik solunum” olarak bilinen bir oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarından alırlar.
- 2) **Mikroaerofil aerob:** Aerob ortamda katı besiyeri yüzeyinde üreyemeyen, anaerob ortamda ise minimal üreme gösteren fakat indirgenmiş oksijenli ortamda optimum üreyebilen bakterilerdir. Üremeleri için yaklaşık %3-10 O₂'ye gereksinimi olan bakterilerdir (Ör. *Campylobacter* spp., *Lactobacillus* spp.).

Anaeroblar: Oksijensiz ortamda yaşayan ve üreyebilen bakterilerdir. Moleküler oksijen ile ilişkilerine göre dört alt guruba ayrılırlar.

- 3) **Zorunlu anaeroblar:** Oksijen konsantrasyonu %0,5'den fazla olan ortamlarda üreyemeyen ancak mutlak bir anaerob ortamda (%0 O₂) üreyebilen anaeroblardır. Zorunlu anaeroblar kısa süreli hava temasında ölürler (Ör. *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp.). Bu grup içinde ılımlı anaeroblar (moderate obligate) olarak adlandırılan %2-8 O₂ varlığında üreyebilenler de bulunur (Ör. *Bacteroides fragilis* grubu, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas* grupları). Ilımlı anaeroblar havadaki oksijenden bir kaç saat etkilenmeyebilir ancak üremek için anaerob ortama ihtiyaç duyarlar.
- 4) **Mikroaerotolerant anaeroblar:** Anaerob ve mikroaerofil ortamlarda üreyebilen fakat karbondioksitli ortam (%15 O₂) ya da havada üreyemeyen bakterilerdir (Ör. *Clostridium tertium*, *Clostridium histolyticum*).
- 5) **Aerotolerant anaeroblar:** En iyi üremeyi anaerob ortamda gerçekleştirebilen ancak hava ve karbondioksitli ortam gibi moleküler oksijen içeren ortamlarda da üreyebilen bakterilerdir (Ör. *C. histolyticum*).

- 6) **Fakültatif anaeroblar:** Oksijenli ya da oksijensiz ortamda yaşayabilirler. Bazen fakültatif aerob olarak da adlandırılabilirler. Klinik örneklerden rutin olarak izole edilen bakterilerin çoğu fakültatif anaerobdur (Ör. *Proteus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. vb.).

Tablo 2.1. Bakterilerin çeşitli moleküler oksijen konsantrasyonlarında üreyebilmelerine göre gruplandırılması (Külekçi ve Topcuoğlu, 2011).

Grup	Üreme			
	Hava (~%21 O ₂)	CO ₂ (%15 O ₂)	Mikroaerofil (%3-10 O ₂)	Anaerob (%0 O ₂)
Zorunlu aerob	9	9	8	1
Mikroaerofil aerob	0	7	9	1
Fakültatif anaerob	9	9	9	9
Aerotolerant anaerob	4	6	8	9
Mikroaerotolerant anaerob	0	0	8	8
Zorunlu anaerob	0	0	0	9

0, üreme yok; 1, seyrek ufak koloniler; 2, seyrek, küçük ve orta koloniler; 3, seyrek, büyük koloniler; 4, orta sıklıkta, ufak koloniler; 5, orta sıklıkta, küçük ve orta koloniler; 6, orta sıklıkta, büyük koloniler; 7, çok, ufak koloniler; 8, çok, küçük ve orta koloniler; 9, çok, büyük koloniler.

2.3. Anaerobların Yaşam Koşulları

Anaerobiyoz, moleküler oksijen eksikliğinde oluşan yaşamı anlatmak için kullanılan bir terimdir. Anaeroblar enerjilerinin çoğunu aeroblar gibi oksidasyon-redüksiyon (redoks) reaksiyonlarından elde ederler. Anaeroblar, aeroblardan farklı olarak solunum yerine fermentasyon reaksiyonlarını kullanırlar. Fermentatif reaksiyonlarda elektronlar, bir organik bileşikten (elektron vericisi) diğerine (elektron alıcısı) geçer ve moleküler oksijen bu reaksiyona girmez. Oksidasyon (yükseltgenme), elektron kaybıdır yani okside olursa elektron sayısı azalır. Redüksiyon (indirgenme) ise elektron almaktır, bir madde redükte olursa elektron sayısı artar.

Bazı anaeroblar için moleküler oksijen tek başına toksik olmasına karşın moleküler oksijen redükte olduğu zaman anaeroblar için çok daha toksik maddeler ortaya çıkar. Bu maddeler şu şekildedir;

- $O_2 + e^- = \cdot O_2$ (süperoksit anyon)
- $O_2 + 2e^- = H_2O_2$ (hidrojen peroksit)
- $O_2 + 3e^- = H_2O + OH^-$ (hidroksil radikal)
- $O_2 + 4e^- = H_2O$

Oksijenin indirgenmesi sonucu ortaya çıkan bu toksik ürünler besiyeri içeriklerine, bakteri enzim sistemine, proteinlere, lipidlere ve hücre duvarına ciddi zarar verebilirler. Bu toksik maddeler anaerobların üremesini engeller; kültürde izole edilebilmeleri için bunlardan kaçınılmalıdır.

Aerobik solunum yapan canlılarda kendisini süperoksit anyon ve toksik türevlerinden koruyan bir ya da birden fazla enzim vardır. Bu enzimlerin en önemlisi, süperoksit dismutazlar (SOD) enzim grubudur. SOD, aerob solunum yapan tüm hücre tiplerinde son elektron alıcısı olarak bulunur. SOD, iki süperoksit anyonunu katalizleyerek bir oksijen molekülüne ve bir hidrojen peroksit dönüştürür, ortaya çıkan hidrojen peroksit ise katalaz enzimi varlığında su ve oksijene dönüşür. Hidrojen peroksit aynı zamanda peroksidaz enzimi ile de parçalanır (Kıyan, 1999; Kurtz, 2003; Külekçi ve Topcuoğlu, 2011).



Bazı zorunlu anaeroblar oksijenin toksik etkisini gidermek için değişen miktarlarda SOD üretir. Anaerob bakterilerin oksijeni tolere etmesinde katalaz ya da peroksidaz enzimleri de görev alır. Zorunlu anaerobların çoğu katalaz üretmese de bazıları (Ör. *B. fragilis* ve *Propionibacterium acnes*) bu enzimi üretir (Külekçi ve Topcuoğlu, 2011). Rolfe ve ark., (1978) yaptıkları çalışmada, SOD aktivitesi ile oksijen toleransı arasında bir korelasyon olduğunu, ancak dikkate değer istisnalar olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada fakültatif bakterilerin tümü peroksidaz içerirken anaerobik bakterilerin hiçbiri bu enzimin ölçülebilir miktarlarına sahip olmadığı, ayrıca katalaz aktivitesinin bakteriler arasında değişken olduğu ve oksijen toleransı ile hiçbir ilişki göstermediği belirtilmiştir. Bu enzimlerin yokluğu oksijen metabolizmasının toksik ürünlerinin birikimine neden olmakta ve böylece bakteri üzerine toksik etki göstermektedirler. Oksijenin anaeroblara kısa süreli etkisi bakteriyostatik, uzun süreli etkisi ise bakterisid şeklinde olmaktadır (Kıyan, 1999; Külekçi ve Topcuoğlu, 2011).

Bazı anaerobların üremesinin başlaması için ortamdan oksijeni çıkartmak tek başına yeterli olmayabilir. Anaerob bakterilerin yaşam ve üreme koşullarıyla ilgili önemli bir

diğer parametre de ortamın redoks potansiyelidir. Redoks potansiyeli kısaca Eh olarak ifade edilir ve volt (V) ya da milivolt (mV) olarak nitelendirilir. Eh, bir sistemin elektronları alma (+) ya da verme (-) durumunu ifade eder. Ortamın Eh değeri, birisi ölçme diğeri hidrojen referans elektrodu olmak üzere iki elektrod kullanarak ölçülebilir. Resazurin boyası ile besiyerlerinin Eh değeri ölçülebilir. Anaeroblar ancak düşük ya da negatif redoks potansiyeli olan ortamlarda üreyebilirler. Resazurin boyası içeren besiyerlerinin renksizden pembeye dönmesi besiyerinin okside olduğunu gösterir. Anaerob besiyerlerinin redoks potansiyelini düşürmek için besiyerine dithiothreitol, thioglycolate ve cysteine gibi indirgeyici maddeler ilave edilir. Bakteriler vücutta üredikleri bölgelerdeki redoks potansiyelini düşürme eğilimindedir. Belli bir bölgenin Eh değeri, o bölgede yaşayan bakteri florasının en can alıcı belirleyicisidir (Kıyan, 1999; Tunçkanat, 2008a; Külekçi ve Topcuoğlu, 2011).

2.4. Normal Floradaki Anaerobların Önemi ve Dağılımı

Anaerob bakteriler insan ve hayvan vücut florasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Endojen floraların içerisinde yer alan anaeroblara endojen anaeroblar, vücut dışında bulunan ya da vücut dışından kaynaklanan enfeksiyon etkeni anaeroblara ise eksojen anaeroblar denilir. Endojen floralardaki anaerobların çoğu insan sağlığının korunmasına önemli katkıları vardır.

Anaeroblar floradaki diğer mikroorganizmalarla birlikte, konağı eksojen patojen bakterilere karşı korurlar. Anaeroblar gastrointestinal sistemde (GİS) potansiyel kanserojen ve toksik maddeleri parçalarlar. Konağa faydalı olan yağ asitlerinin, vitaminlerin ve kofaktörlerin kaynağıdır. Aynı zamanda yeni doğan bağışıklık sisteminin gelişmesinde de görev alırlar. Endojen anaerobların bu yararlarının yanı sıra çoğu normal koşullarda hastalık oluşturmazken, bazı koşullarda enfeksiyonlara neden olabildiklerinden fırsatçı patojendirler. Çeşitli enfeksiyonlarda oluşabilecek kontaminasyonu ayırt etmek için normal vücut floraları hakkında bilgi sahibi olmak tanı için önemlidir (Külekçi ve Topcuoğlu, 2011).

İnsan vücudunda üst solunum yolu (ÜSY), GİS, kadın genital organları ve cilt florası olmak üzere dört farklı bölge anaerob bakteriler için önemli kaynak oluşturmaktadır. Bununla birlikte anaerobların yoğunluğunu ve çeşitliliğini oksijen gerilimi, pH ve bakteriyel aderens değişiklikleri gibi ortamdaki farklılıklar etkilemektedir (Tablo 2.2) (Tunçkanat, 2008a; Külekçi ve Topcuoğlu, 2011; Brook, 2017).

Deri: Deri anaerob florası *Propionibacterium* cinsi (genellikle *P. acnes*), anaerob Gram pozitif koklar ve bazen *Eubacterium* cinsi bakterilerden oluşmaktadır (Külekçi ve Topcuoğlu, 2011).

Üst solunum sistemi: Ağız boşluğu, nazofarinks ve orofarinks dahil üst solunum yollarının mikroflorası karmaşıktır ve birçok zorunlu anaerob türü içerir. Tükürükte bulunan bakterilerin %90'ı anaerobdur. Ağız boşluğunda yaşayan anaerob bakterilerin çeşitliliği muhtemelen ağız boşluğunun bölümlerindeki oksijen konsantrasyonundaki büyük farklılıklar nedeniyle ortaya çıkar. Ağız lezyonlarının tamamında, aspirasyon pnömonisi olgularının çoğunluğunda ve kulak burun boğaz enfeksiyonlarında anaeroblar yer alır. Bu bölgelerde sıklıkla *Fusobacterium* (özellikle *F. nucleatum*), *Porphyromonas*, pigmentli *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces* ve *Lactobacillus* cinsleri bulunur (Hentges, 1993; Külekçi ve Topcuoğlu, 2011).

Tablo 2.2. İnsan normal florasındaki aerob, anaerob bakteri sayıları ve predominant anaerobik bakteriler (Brook, 2017).

Anatomik bölge	g ya da ml'deki total bakteri sayısı		Predominant anaerobik bakteriler
	Aeroblar	Anaeroblar	
Deri	-	-	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Peptostreptococcus</i> spp.
Ağız/ÜSY	10^8-10^9	10^9-10^{11}	Pigmentli <i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Actinomyces</i> spp.
Gastrointestinal sistem			<i>Bacteroides fragilis</i> grubu <i>Clostridium</i> spp.
Üst	10^2-10^5	10^3-10^7	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
Alt	10^5-10^9	$10^{10}-10^{12}$	<i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Eubacterium</i> spp.
Kadın genital sistemi	10^8	10^9	<i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Prevotella disiens</i> <i>Prevotella bivia</i>

Gastrointestinal sistem: Gastrointestinal flora bakteri konsantrasyonunda farklı seviyelerde değişiklik gösterir. Mide, duodenum, jejunum ve proksimal ileum normalde nispeten az sayıda bakteri içerir. Bağırsak hareketliliğinde kesinti, anaerobik ve aerobik bakteri sayısında bir artışa neden olabilir. GİS florasının en yüksek sayıdaki anaerob bakterileri *B. fragilis* grubu, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, anaerob Gram pozitif koklar, *Prevotella* ve *Porphyromonas* türleri ve diğerleridir. *B. fragilis* grubu içinde en sık rastlanan *B. thetaiotaomicron* ve *B. vulgatus*'dur (Brook, 2002; Külekçi ve Topcuoğlu, 2011).

Kadın genital sistemi: Dişi genital florası karışık aerobik ve anaerobik bakterilerden oluşur. Bununla birlikte bakteri konsantrasyonu ve tipi, gastrointestinal floraninkinden daha az karardır ve antimikrobiyal tedavi, hormonlar, adet döngüsü, gebelik ve jinekolojik cerrahi ameliyattan etkilenebilir. *Peptostreptococcus*, *Prevotella* anaerobik *Lactobacillus* ve *Actinomyces* cinsleri en sık rastlananlardır. Diğer anaeroblar anüse yakınlığından ötürü *Clostridium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Porphyromonas* türleridir. Gram negatif çomaklar arasında *P. bivia* ve *P. disiens* en sık rastlananlardır. Bakteriyel vajinoz, floradaki bakteri sayısındaki değişiklikler ve laktobasil konsantrasyonundaki azalma ile ilişkilidir. Vagina ve servikal sürüntü örneklerinde enfeksiyona sebep olan bakteriyel etken normal floradan ayırt edilemeyeceğinden, genitoüriner sistem sürüntü örnekleri anaerob bakteriyoloji için uygun değildir (Külekçi ve Topcuoğlu, 2011; Brook, 2017).

2.5. Anaerob Bakterilerin Patojenitesi ve Virülans Faktörleri

Anaeroblar insanların normal florasında bulunan organizmalardır. Örneklerin taşınmasına özen gösterildiğinde hemen hemen her enfeksiyon bölgesinden anaeroblar izole edilebilir. Bununla birlikte, anaerobik organizmalar en sık apse boşluklarında veya nekrotik dokularda bulunur (Zaleznik ve Kasper, 1989). Anaerob enfeksiyonların oluşmasında en önemli faktör, normal florada bulunan bu bakterilerin anatomik bütünlüğün bozulması sonucunda, bulundukları bölgeden başka bölgelere özellikle de steril vücut bölgelerine geçmeleridir. Enfeksiyonun başlaması için aynı zamanda anaerob bakterilerin üreyebilmeleri için gerekli koşullarında oluşması gerekir. Travma, doku harabiyeti, nekroza yol açan durumlar, organ perforasyonları, cerrahi müdahale, anatomik bariyerin bütünlüğünün bozulması, immün sistemin zayıflaması ve lokal doku oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin düşmesi gibi durumlar anaerob bakterilerin

üremesi için gerekli koşulları hazırlar (Cohen-Poradosu ve Kasper, 2015). Anaerob enfeksiyonlar genellikle anaerob ve fakültatif anaerob bakterilerin birlikte katıldıkları mikst enfeksiyonlar şeklinde görülürler, ancak tek başına etken oldukları enfeksiyonlarda vardır (Tunçkanat, 2008a). Anaerob enfeksiyonların çoğu genelde endojen kaynaklıdır, ancak bazı klostridyal enfeksiyonlarda (botulizm, tetanoz vb.) olduğu gibi ekzojen kaynaklı da olabilirler (Bartlett, 2004).

Anaerob bakterilerin virülans faktörleri başlıca dört başlık altında toplanabilir;

- 1) **Aderens:** Kolonizasyon veya enfeksiyon oluşumu için bir mikroorganizmanın en önemli yeteneklerinden biri epitel hücrelerine yapışabilme kabiliyetidir (Zaleznik ve Kasper, 1989). Bazı anaerob bakterilerin sahip olduğu, konak hücrelerin yüzeyine tutunmada rol oynayan fimbrial ve non-fimbrial adezinler bu bakterilerin önemli virülans faktörleri arasındadır. *Porphyromonas gingivalis*'te hemagglütinasyon ve aderensden sorumlu fimbria olduğu gösterilmiştir. *Fusobacterium nucleatum*'da da aderens ve hemagglütinasyondan sorumlu lektin benzeri adezinler bulunmaktadır. Anaerob bakterilerin koagrege olabilmeye yetenekleri diğer bir önemli aderens özellikleridir (Tunçkanat, 2008a).
- 2) **İnvazyon:** Konakçı hücrelere invaze olma yeteneği birçok patojenik bakteri için önemli bir virülans faktörüdür. Hücre içi ortam bakteriyi konağın bağışıklık sisteminden ve bazı antibiyotiklerden korur (Tang ve ark., 1993). Gram pozitif anaerobik basiller (*C. tetani*, *C. perfringens* vb.) ve çoğu Gram negatif anaerobik basil, sağlıklı epitel veya mukozal yüzeylerde invaziv değildir (Duerden, 1994). Bununla birlikte bazı çalışmalarda *P. gingivalis*'in ve *F. nucleatum*'un insan epitelyal, endotel ve düz kas hücreleri de dahil olmak üzere farklı hücre tiplerine bağlanıp direkt invazyon yaptığı ve komşu hücrelere yayıldığını göstermiştir. *P. gingivalis*'in fimbriaları aracılığıyla, *F. nucleatum*'un ise FadA adezinleri, fosofolipaz C ve proteaz ile konak hücrelerine invaze olduğu gösterilmiştir (Zaleznik ve Kasper, 1989; Duerden, 1994; Yilmaz ve ark., 2006; Xu ve ark., 2007; Li ve ark., 2008).
- 3) **Yüzey bileşenleri:** Kapsüler polisakkarit ve lipopolisakkarit (LPS) gibi yüzey bileşenleri de anaerob bakterilerin sahip oldukları bir diğer virülans faktörüdür. *B. fragilis*'in kapsül polisakkariti ile yapılan çalışmalar kapsülün opsonofagositozu inhibe etmek suretiyle apse oluşumuna yol açtığını ve kapsüler materyalin tek

başına apse oluşturma yeteneğinde olduğunu göstermiştir (Tunçkanat, 2008a). *Fusobacterium*, *Porphyromonas* ve *Prevotella* türlerinde de aynı özellikte kapsülleri vardır. Endotoksik LPS, konakta sistemik inflamasyonun ve septik şokun oluşmasını sağlar (Garrett ve Onderdonk, 2015). Gram negatif anaeroblarda bulunan LPS'nin biyolojik aktivitesi, Gram negatif aerobik bakterilerin LPS'sinden 100-1000 kat daha az olduğu için konakta inflamatuvar yanıt oluşturmaz. *F. nucleatum*'un LPS'si aerob bakterilerinkine benzer bir yapıda olduğu için virülansı yüksektir (Brook, 2017).

- 4) **Enzim ve toksinler:** Klinik önemi olan anaerob bakterilerin ürettikleri çeşitli enzim ve toksinler dokuların bozulmasına yol açarak ya da patojeni konakçı savunma mekanizmalarından koruyarak bakteri virülansında önemli rol oynarlar (Namıkoğlu, 1990). Anaerob bakterilerin ürettikleri toksin ve enzimler arasında kollojenaz, elastaz, hemolizin, lesitinaz, hiyaluronidaz, kondroitin sülfataz, lipaz, jelatinaz, nörominidaz, heparinaz, fosfataz, DNaz, RNaz, immünoglobulin proteazlar, gibi çok çeşitli enzim ve toksinler sayılabilir (Garrett ve Onderdonk, 2015). Bazı anaeroblarda bulunan SOD enzimi, bu bakterilerin oksijene toleransını artırarak bir virülans faktörü oluşturmaktadır. *B. fragilis* suşlarının bazıları enterotoksin yapmaktadır. *Clostridium* türlerinden *C. tetani*'nin (tetanospazmin ve tetanolizin), *C. botulinum*'un (tip A toksini), *C. difficile*'nin (toksin A enterotoksin, toksin B sitotoksin) ve *C. perfringens*'in (alfa toksin olan fosfolipaz C) toksinleri anaeroblar arasında en önemli patogeneze sahip olanlardır (Zaleznik ve Kasper, 1989; Tunçkanat, 2008a; Gerding ve Young, 2015; Hodowanec ve Bleck, 2015b; 2015a; Onderdonk ve Garrett, 2015).

Anaerob bakterilerin potansiyel virülans faktörlerinden bazıları Tablo 2.3'de özetlenmiştir (Brazier, 2010; Wren, 2010; Cohen-Poradosu ve Kasper, 2015; Fader, 2019)

Tablo 2.3. Anaerob bakterilerin potansiyel virülans faktörleri (Brazier, 2010; Wren, 2010; Cohen-Poradosu ve Kasper, 2015; Fader, 2019).

Virülans Faktör	Anaeroblar
Kapsül	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , GPAK
Adherens Faktörleri	<i>B. fragilis</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>Fusobacterium</i> spp.
Proteazlar	<i>B. fragilis</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.
Lipopolisakkarit	<i>P. gingivalis</i> , <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Veillonella</i> spp.
Hemolizin	<i>P. gingivalis</i> , <i>F. necrophorum</i> , <i>Clostridium</i> spp., GPAK
Lökotoksin	<i>Fusobacterium</i> spp.
Nöraminidaz	<i>B. fragilis</i>
Enterotoksin	<i>B. fragilis</i> , <i>Clostridium difficile</i>
Fosofolipazlar	<i>Clostridium</i> spp., <i>F. necrophorum</i>
Sitotoksin	<i>C. difficile</i>
DNaz	<i>Clostridium</i> spp., GPAK
Hiyalüronidaz	<i>Clostridium</i> spp., GPAK
Lipazlar	<i>Clostridium</i> spp.
Nörotoksinler	<i>C. botulinum</i> , <i>C. tetani</i>
DNaz , Deoksiribonükleaz; GPAK , Gram pozitif anaerobik koklar.	

2.6. Klinik Örneklerden Elde Edilen Anaerob Bakteriler ve Sınıflandırma

Bir organizmanın doğru şekilde sınıflandırılması ve tanımlanması, hem klinisyenler hem de mikrobiyologlar için önemlidir. Anaerobların ilk yapılan sınıflandırılmaları morfolojik görünümleri ve fenotipik karakterleri dikkate alınarak yapılmıştır (Finegold, 2004). Taksonomi çalışmalarında çeşitli moleküler biyolojik tekniklerin kullanılmaya başlanmasıyla anaerobların sınıflandırılmasında değişiklikler olmuştur. Bu çalışmalar birçok yeni türün ve diğer taksonların tanımlarıyla sonuçlanmıştır (Procop ve ark., 2017).

Taksonomideki son değişiklikler dikkate alınarak anaerob bakterilerin gram boyama ve morfolojik özelliklerine göre geniş bir şekilde sınıflandırılması Tablo 2.4'de gösterilmiştir. Klinik olarak önemli olan ve/veya klinik örneklerden en sık izole edilen anaerob bakterilerin gram boyama ve morfolojik özelliklerine göre güncel sınıflandırılması Tablo 2.5'de gösterilmiştir (Hall ve Copsey, 2015; KÖnÖnen ve ark., 2015; Song ve Finegold, 2015; Procop ve ark., 2017).

Tablo 2.4. Anaerobik bakterilerin Gram boyama ve mikroskopik morfolojilerine göre sınıflandırılması (Hall ve Copsey, 2015; KÖnÖnen ve ark., 2015; Song ve Finegold, 2015; Procop ve ark., 2017).

Gram Negatif Basil	Gram Negatif Kok	Gram Pozitif Sporlu Basil	Gram Pozitif Sporsuz Basil	Gram Pozitif Kok
<i>Alistipes</i>	<i>Acidominococcus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Adlercreutzia</i>	<i>Anaerococcus</i>
<i>Alloprevotella</i>	<i>Anaeroglobus</i>	<i>Desulfomaculum</i>	<i>Alloscardovia</i>	<i>Anaerosphaera</i>
<i>Anaerobiospirillum</i>	<i>Megasphaera</i>	<i>Desulfosporosinus</i>	<i>Anaerofustis</i>	<i>Atopobium</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>Negativococcus</i>	<i>Caloramator</i>	<i>Anaerostipes</i>	<i>Blautia</i>
<i>Barnesiella</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Filifactor</i>	<i>Anaerotruncus</i>	<i>Coprococcus</i>
<i>Bilophila</i>		<i>Moorella</i>	<i>Actinobaculum</i>	<i>Finegoldia</i>
<i>Butyrivibrio</i>		<i>Oxobacter</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Gallicola</i>
<i>Catonella</i>		<i>Oxalophagus</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Gemmiger</i>
<i>Christensenella</i>			<i>Bifidobacterium</i>	<i>Gemella</i>
<i>Coprobacter</i>			<i>Bulleidia</i>	<i>Murdochella</i>
<i>Desulfuromonas</i>			<i>Catabacter</i>	<i>Peptococcus</i>
<i>Desulfovibrio</i>			<i>Catenibacterium</i>	<i>Peptoniphilus</i>
<i>Dialister</i>			<i>Cryptobacterium</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
<i>Faecalibacterium</i>			<i>Collinsella</i>	<i>Ruminococcus</i>
<i>Fretibacterium</i>			<i>Dorea</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Fusobacterium</i>			<i>Eggerthella</i>	<i>Slackia</i>
<i>Johnsonella</i>			<i>Eubacterium</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Jonquetella</i>			<i>Faecalibacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Leptotrichia</i>			<i>Flavonifractor</i>	
<i>Megamonas</i>			<i>Gordonibacter</i>	
<i>Mitsuokella</i>			<i>Holdemania</i>	
<i>Odoribacter</i>			<i>Lachnospira</i>	
<i>Parabacteroides</i>			<i>Lactobacillus</i>	
<i>Paraprevotella</i>			<i>Marvinbryantia</i>	
<i>Parasutterella</i>			<i>Methanobacterium</i>	
<i>Phascolarctobacterium</i>			<i>Mobiluncus</i>	
<i>Phocaeicola</i>			<i>Mogibacterium</i>	
<i>Porphyromonas</i>			<i>Olsenella</i>	
<i>Prevotella</i>			<i>Oribacterium</i>	
<i>Pseudoflavonifractor</i>			<i>Paraeggerthella</i>	
<i>Pyramidobacter</i>			<i>Parascardovia</i>	
<i>Selenomonas</i>			<i>Propionibacterium</i>	
<i>Sneathia</i>			<i>Propioniferax</i>	
<i>Spirochaeta</i>			<i>Propionimicrobium</i>	
<i>Succinatimonas</i>			<i>Pseudoramibacter</i>	
<i>Succinomonas</i>			<i>Robinsoniella</i>	
<i>Succinivibrio</i>			<i>Roseburia</i>	
<i>Sutterella</i>			<i>Scardovia</i>	
<i>Tannerella</i>			<i>Shuttleworthia</i>	
<i>Tissierella</i>			<i>Slackia</i>	
<i>Treponema</i>			<i>Solobacterium</i>	
			<i>Turicibacter</i>	
			<i>Varibaculum</i>	

Tablo 2.5. Klinik olarak önemli olan ve/veya klinik örneklerden en sık izole edilen anaerob bakteriler (Procop ve ark., 2017).

Gram Negatif Basiller	
<i>Bacteroides fragilis</i> grubu	<i>B. fragilis</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>B. ovatus</i>
Diğer <i>Bacteroides</i> 'ler	<i>B. ureolyticus</i>
<i>Parabacteroides distasonis</i>	
<i>Porphyromonas</i>	<i>P. asaccharolytica</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. endodontalis</i>
Pigmentli <i>Prevotella</i>	<i>P. melaninogenica</i> , <i>P. loescheii</i> , <i>P. denticola</i> , <i>P. tanneriae</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>P. corporis</i>
Pigmentsiz <i>Prevotella</i>	<i>P. oralis</i> group, <i>P. oris/buccae</i> , <i>P. bivia</i> , <i>P. disiens</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>F. nucleatum</i> , <i>F. necrophorum</i> , <i>F. mortiferum</i> , <i>F. varium</i>
<i>Bilophila wadsworthia</i>	
Anaerobik Koklar	
Gram Pozitif Koklar	<i>Fingoldia magna</i> , <i>Parvimonas micra</i> , <i>Anaerococcus prevotii</i> , <i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i> , <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>Staphylococcus saccharolyticus</i> , <i>Atopobium parvulum</i>
Gram Negatif Koklar	<i>Veillonella</i> spp.
Sporsuz Gram Pozitif Basiller	
<i>Actinomyces</i>	<i>A. israelii</i> , <i>A. meyeri</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>A. turicensis</i> , <i>A. graevenitzii</i> , <i>A. viscosus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acnes</i> ve <i>P. propionicum</i>
Diğer Gram pozitif basiller	<i>Atopobium vaginae</i> , <i>Eggerthella lenta</i> , <i>Bifidobacterium dentium</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Paraeggerthella</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.
Sporlu Gram Pozitif Basiller	
<i>Clostridium</i>	<i>C. perfringens</i> , <i>C. innocuum</i> , <i>C. ramosum</i> , <i>C. difficile</i> , <i>C. bifermentans</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordelli</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. histolyticum</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>C. tertium</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. clostridioforme</i> grup (<i>C. clostridioforme</i> , <i>C. hathewayi</i> , <i>C. bolteae</i> , <i>C. citroniae</i> , <i>C. aldenense</i> , <i>C. lavalense</i>)

2.7. Anaerob Bakterilerden Kaynaklanan Enfeksiyonlar

Anaerobik bakteriler normal insan florasının büyük bir kısmını oluşturmalarına rağmen, insan enfeksiyonlarında nispeten az sayıda bulunurlar. Anaerobları içeren enfeksiyonlar sıklıkla polimikrobiyaldir fakat tek başına etken olduğu enfeksiyonlar da bulunmaktadır. İnsan vücudundaki tüm enfeksiyon tiplerinde yer alabilirler. Anaerob enfeksiyonların ana kaynağı endojen kaynaklıdır. Ancak tetanoz, botulizm, gazlı gangren, *C. perfringens* besin zehirlenmesi, nekrotizan enterit gibi bazı *Clostridium* cinsi

bakterilerin enfeksiyonları eksojen kaynaklıdır. Bu durumun tek istisnası *C. difficile* ile ilişkili diyare ya da kolit gibi enfeksiyonlar endojen kaynaklıdır. Endojen ve eksojen kaynaklı enfeksiyonlar Tablo 2.6'da, anaerobların yaygın olarak etken olduğu enfeksiyon tipleri ve oranları ise Tablo 2.7'de, özetlenmiştir (Külekçi ve Topcuoğlu, 2011; Cohen-Poradosu ve Kasper, 2015; Procop ve ark., 2017).

Klinik örneklerden en sık izole edilen anaeroblar; *Bacteroides fragilis* grubu (%34), anaerob Gram pozitif koklar (%28), *Fusobacterium* türleri (%7,9) ve pigmentli Gram-negatif çomaklar (*Prevotella* ve *Porphyromonas*) <(%6,4)'dır (Külekçi ve Topcuoğlu, 2011).

Tablo 2.6. Eksojen ve endojen kaynaklı anaerob bakteri enfeksiyonları (Procop ve ark., 2017).

Eksojen Kaynaklı Anaerob Enfeksiyonlar	Endojen Kaynaklı Anaerob Enfeksiyonlar
<i>C. perfringens</i> kaynaklı gastroenterit	Aktinomikoz
Miyonekroz (Gazlı Gangren)	Apandisit veya kolesistit komplikasyonları
Krepitan anaerobik selülit	Aspirasyon pnömonisi
Tetanoz	Bakteriyel vajinoz
Benign yüzeyel enfeksiyonlar	Bakteriyemi
İnfant botulizmi	Dental ve periodontal enfeksiyonlar
Gıda kaynaklı botulizm	Endokardit
Yara botulizmi	Herhangi bir organda oluşan apse
Septik abortus	Krepitan ve nonkrepitan selülit
Nozokomiyal <i>C. difficile</i> diyaresi	Lemierre sendromu (<i>F. necrophorum</i>)
Hayvan veya insan ısırıklarından kaynaklanan enfeksiyonlar	Endoftalmi (genellikle katarakt ameliyatı sonrası)
İlaç bağımlılarında görülen enjeksiyon kaynaklı enfeksiyonlar	Menenjit (genellikle beyin absesiyle ilişkili komplikasyon)
	Kronik sinüzit
	Kronik otitis media
	Osteomyelit
	Nekrotizan fasit
	Nekrotizan pnömoni
	Peritonit
	Septik artrit
	Subdural ampiyem
	Torasik ampiyem

Tablo 2.7. Anaerobların yaygın olarak etken olduğu enfeksiyon tipleri ve pozitif kültür oranları (Procop ve ark., 2017).

Enfeksiyon Tipi	(%)
Pulmoner	
Aspirasyon pnömonisi	62-93
Akciğer apsesi	58-100
Ampiyem (torasik)	22-36
Bakteriyemi	1-17
Beyin apsesi	62-83
Sinüzit	
Kronik sinüzit	48-100
Akut sinüzit	<10
Pelvik abse	50-100
Dental, oral, fasiyal	67-100
Yumuşak doku enfeksiyonları	
Klostridial gazlı gangren	100
Nonklostridial krepitan selülit	75
Diyabetik ayak ülserleri	50-90
Isırık yaraları	50-70
Abdominal	
İntra-abdominal	60-100
Karaciğer apsesi	<60
Çeşitli enfeksiyonlar	
Menenjit	<10
Üriner sistem enfeksiyonları	<5

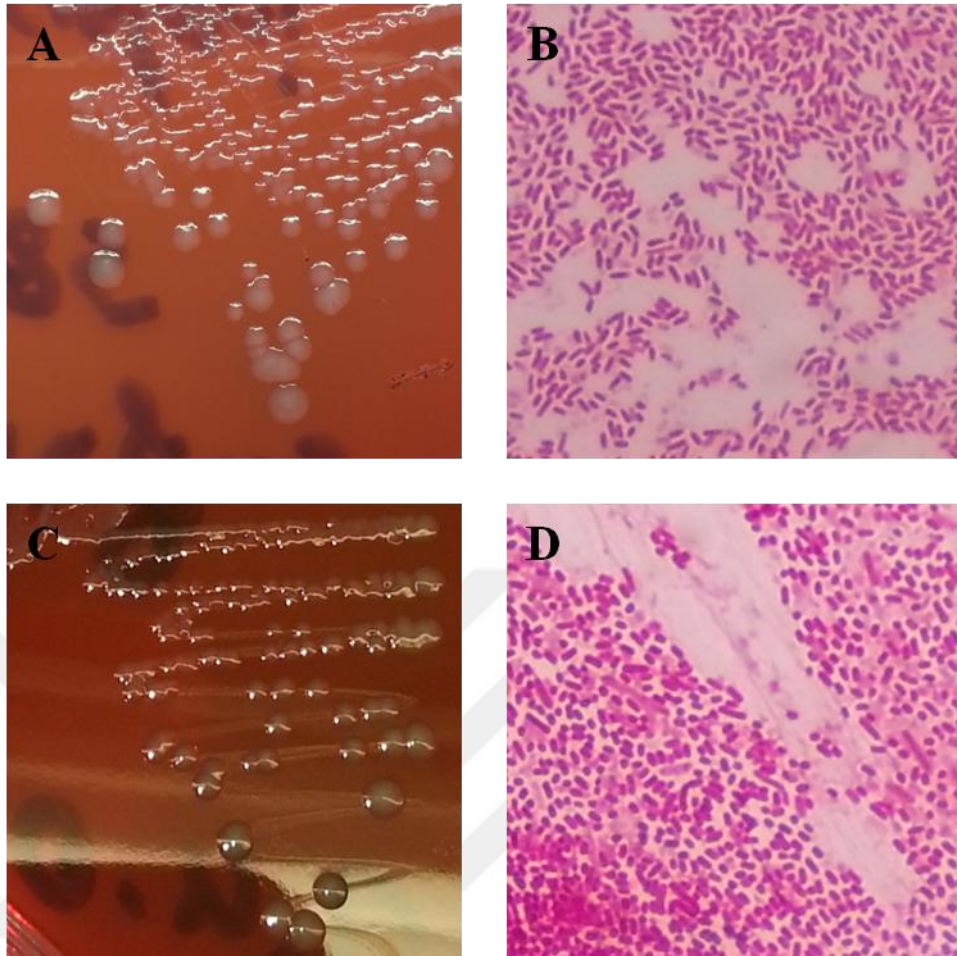
Anaerob enfeksiyonlar, belirti göstermeyen çok düşük şiddetli enfeksiyonlardan, hızla ilerleyen ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlara kadar çeşitlilik gösterebilir. Anaerobik enfeksiyonların teşhisi zor olabilir, ancak bazı klinik belirtilerin ve bulguların tanınmasıyla teşhis hızlandırılabilir. Klinik belirtilerin en spesifik olanı enfeksiyon bölgesinde oluşan kötü kokudur. Anaerobik enfeksiyonu düşündüren faktörler şunlardır; (Finegold, 1989; Brook, 2008; Külekçi ve Topcuoğlu, 2011).

1. Kötü kokulu lezyon veya akıntı
2. Enfeksiyonun mukozal yüzeye yakın olması
3. Apse oluşumu veya doku nekrozu ile karakterize enfeksiyonlar
4. Gaz oluşumu ile karakterize edilen enfeksiyonlar
5. Aerobik kan kültürlerinde üremeyen bakteriyemi veya endokardit

6. Sadece aeroblara karşı etkili antibiyotik kullanımı ile tedavide etkin sonuçların alınamadığı enfeksiyonlar
7. Septik tromboflebit
8. Hayvan veya insan ısırığından sonraki gelişen enfeksiyonlar
9. Gazlı gangren gibi klasik klinik tablonun olması
10. Akıntılarda "kükürt granüllerinin" varlığı (aktinomikoz)
11. Gram boyamasında görülen organizmaların aerobik olarak yetiştirilememesi
12. Tümörlerle veya diğer yıkıcı süreçlerde gelişen enfeksiyonlar
13. Kan içeren eksuda örneklerinin siyah renk değişikliği veya UV ışığı altında kırmızı flüoresans (*Prevotella* veya *Porphyromonas* enfeksiyonu) vermesi
14. Anaerobik enfeksiyona yatkın klinik durum (maternal amniyonit, bağırsak perforasyonu, vb. sonrası)

2.8. *Bacteroides* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Bacteroides cinsi, esas olarak bağırsaktan izole edilmiş sakkarolitik, penisilin ve safraya dirençli, hareketsiz, sporsuz ve pigmentsiz zorunlu anaerob Gram negatif basil veya kokobasillerdir. *Bacteroides*'ler bağırsak florasının yanı sıra insan ve hayvanların üst solunum yolu ve ürogenital sistemlerinin normal florasında da yer almaktadır. *Bacteroides*'ler, diğer anaerob Gram negatif basillerden, %20 safralı ortamda üreyebilmeleri ve kanamisin, kolistin ve vankomisin antibiyotik disklerine dirençli olma özellikleriyle ayırt edilmektedirler. Suşların çoğu kapsüllüdür. Bu bakteriler anaerob koyun kanlı agarda 2-3 mm çapında, beyaz gri renkli, düzgün kenarlı, dairesel, hemoliz yapmayan parlak koloniler oluşturur (Resim 2.1) (Tunçkanat, 2008b; Garrett ve Onderdonk, 2015; KÖnÖnen ve ark., 2015). Bu bakterilerde çoğunluk eskülini hidrolize ederken, indol ve katalaz reaksiyonları türler arasında değişiklik göstermektedir (Fader, 2019).



Resim 2.1. *Bacteroides* cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri (Orijinal). **A**, *B. fragilis* kolonisi; **B**, *B. fragilis* Gram boyaması; **C**, *B. vulgatus* kolonisi; **D**, *B. vulgatus* Gram boyaması.

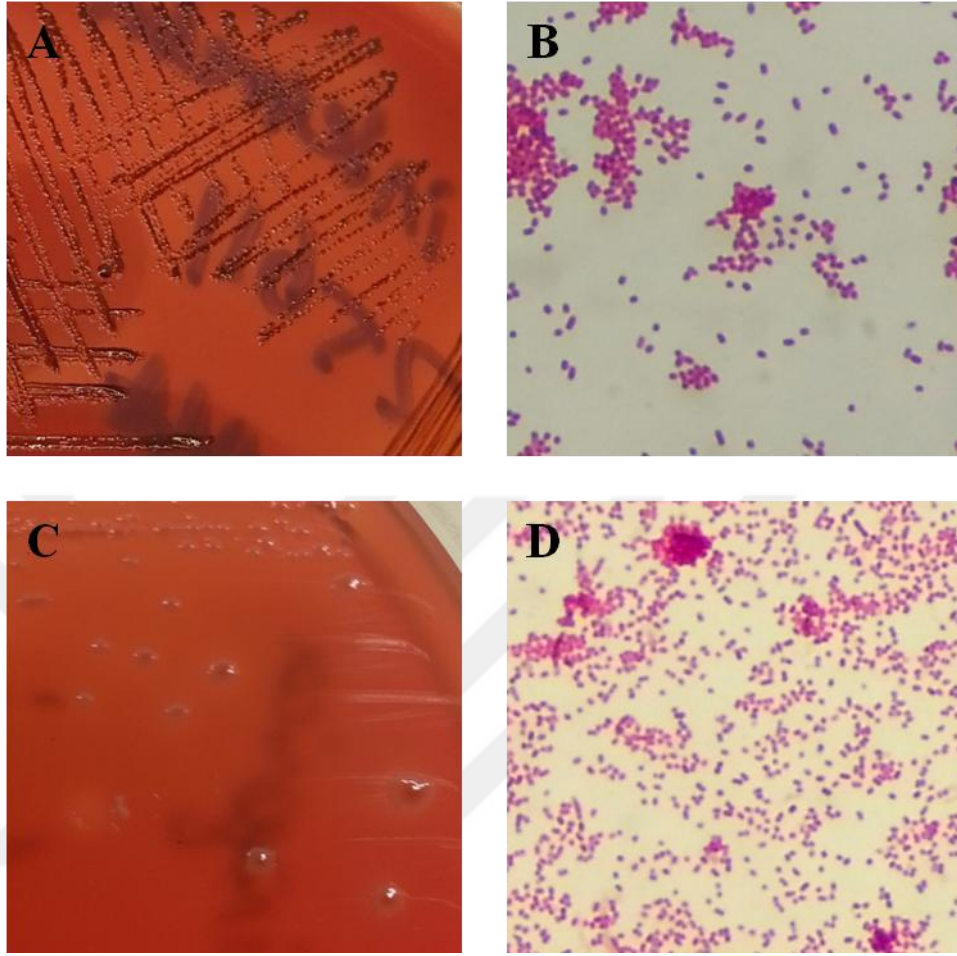
Bu cinsin klinik açıdan en önemli türleri *B. fragilis* grubu içinde yer almaktadır. *B. fragilis* ve bu gruba ait diğer türlerin (*B. caccae*, *B. cellulosilyticus*, *B. clarus*, *B. coprocola*, *B. coprophilus*, *B. dorei*, *B. eggerthii*, *B. faecis*, *B. finegoldii*, *B. fluxus*, *B. fragilis*, *B. intestinalis*, *B. massiliensis*, *B. nordii*, *B. oleiciplenus*, *B. ovatus*, *B. plebeius*, *B. salyersiae*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*, *B. xylanisolvens*) tanımlanması klinik açıdan uygun terapötik tedavi için önemlidir (KÖnÖnen ve ark., 2015). Amerika'da yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada 1997 ile 2007 yılları arasında toplanan 6.574 klinik örnekte *Bacteroides* türleri arasında en sık *B. fragilis* (%52), *B. thetaiotaomicron* (%19,3), *B. ovatus* (%10,3) ve *B. vulgatus* (%6) türleri izole edilmiştir (Snydman ve ark., 2010).

B. fragilis grubu bakteriler önemli anaerob patojenlerdir. *B. fragilis* grubunda yer alan türler diyafram alt bölgesinde gelişen apendisit, kolesistit, pankreatit ve peritonit gibi intra-abdominal enfeksiyonlar, kadın genital sistem enfeksiyonları başta olmak üzere, diyabetik ve dekübit ülserleri, cerrahi yara gibi deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilmektedirler. Nadir olarak, menenjit, beyin apsesi, kronik otit veya sinüzit, osteomyelit, prostatit, akciğer apsesi gibi birtakım enfeksiyonların oluşumuna neden olmakta ve mortalitesi yüksek olan bakteriyemilere yol açabilmektedirler (Tunçkanat, 2008b; Garrett ve Onderdonk, 2015).

B. fragilis grubunda yer alan türler, birçok antibiyotiğe dirençli olmalarından dolayı tedavideki zorlukları yüzünden büyük önem taşımaktadırlar. Dirençli oldukları antibiyotiklerin başında penisilin grubu antibiyotikler gelmektedir. Ayrıca karbapenemler dışındaki birçok β -laktam antibiyotikler, eski kinolonlar bu bakterilerin dirençli olduğu antibiyotikler içerisinde yer almaktadırlar. Avrupa merkezli bir çalışmada *B. fragilis* grubunun amoksisilin-klavulanat, piperasilin-tazobaktam, sefoksitin, klindamisin ve moksifloksasin'e karşı direnç oranlarının arttığı gösterilirken, imipenem, metronidazol ve tigesikline direnç oranlarının ise düşük olduğu bildirilmiştir (Tunçkanat, 2008b; KÖnÖnen ve ark., 2015).

2.9. *Prevotella* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Prevotella türleri mikroskobik olarak soluk boyanan, hareketsiz, sporsuz, küçük Gram negatif kokobasiller olarak gözlenirler. Genellikle kanlı agar üzerinde pürüzsüz, dairesel, parlak koloniler oluşturlar. Kanlı agardaki koloniler yarı saydam, opak, gri, açık kahverengi veya siyah renkte olabilmektedir. Pigmentli *Prevotella* türlerinin kolonileri koyu kahverengi-siyah renkte, *P. melaninogenica*'nın ise açık kahverenginde olmaktadır (Resim 2.2). Pigmentli türlerin kolonileri uzun dalga UV ışığı altında tuğla kırmızısı renginde floresans verme özellikleri vardır. Pigmentli *Prevotella* türleri glikoz ve diğer karbonhidratları fermente etme özellikleri ile *Porphyromonas* cinsine ait pigmentli bakterilerden ayrılırlar. Önemli bir ağız patojeni olan *P. intermedia* indol pozitifliği, lipaz aktivitesine sahip olma ve sükrozu fermente etme özellikleri ile diğer pigmentli *Prevotella* türlerinden ayırt edilebilir. *Prevotella*'lar, diğer anaerob Gram negatif basillerden, kanamisin ve vankomisine dirençli, kolistine ise duyarlı olma özellikleriyle ayırt edilmektedirler (Tunçkanat, 2008b; Shah ve ark., 2010; Garrett ve Onderdonk, 2015; KÖnÖnen ve ark., 2015).



Resim 2.2. *Prevotella* cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri (Orijinal). **A**, *P. intermedia* kolonisi; **B**, *P. intermedia* Gram boyaması; **C**, *P. melaninogenica* kolonisi; **D**, *P. melaninogenica* Gram boyaması.

Prevotella cinsine ait türler ağız boşluğunun egemen mikroorganizmaları arasında bulunurlar ve burada kommensalizmine rağmen hemen hemen her türlü ağız enfeksiyonuna karışabilirler. Ayrıca, *Prevotella* cinsi bakteriler üst ve alt solunum yolu sistemleri, gastrointestinal sistem ve genito üriner sistem florasında da bulunurlar. *Prevotella* cinsi içerisinde pigmentli sakkarolitik türler ile (*Prevotella melaninogenica*, *P. corporis*, *P. denticola*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. loescheii*, *P. tannerae*, *P. pallens*) gene sakkarolitik ancak pigment oluşturmeyen türler (*P. bivia*, *P. buccae*, *P. buccalis*, *P. dentalis*, *P. disiens*, *P. enoeca*, *P. heparynolytica*, *P. oralis*, *P. oris*, *P. oulorum*, *P. salivae*, *P. shahii*, *P. tannerae* - pigment oluşturmeyen suşlar, *P. uenoni*, *P. veroralis*, *P. zoogloformans*) yer almaktadır. En sık izole edilenleri *P. melaninogenica*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. bivia* ve *P. disiens*'dir.

Başta *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. melaninogenica* olmak üzere *Prevotella* cinsi bakteriler çoğunlukla üst solunum yollarıyla ilişkili enfeksiyonlarda bulunurlar. *P. amnii*, *P. bivia*, *P. corporis*, *P. disiens*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* ve *P. timonensis* kadın genital sisteminde meydana gelen enfeksiyonlarda görülürler. *Prevotella* türleri aynı zamanda beyin ve akciğer apselerinde, deri ve yumuşak doku, baş-boyun, plöropulmoner enfeksiyonlar ve bakteriyemi olgularında da etken olmaktadır (Tunçkanat, 2008b; KÖnÖnen ve ark., 2015).

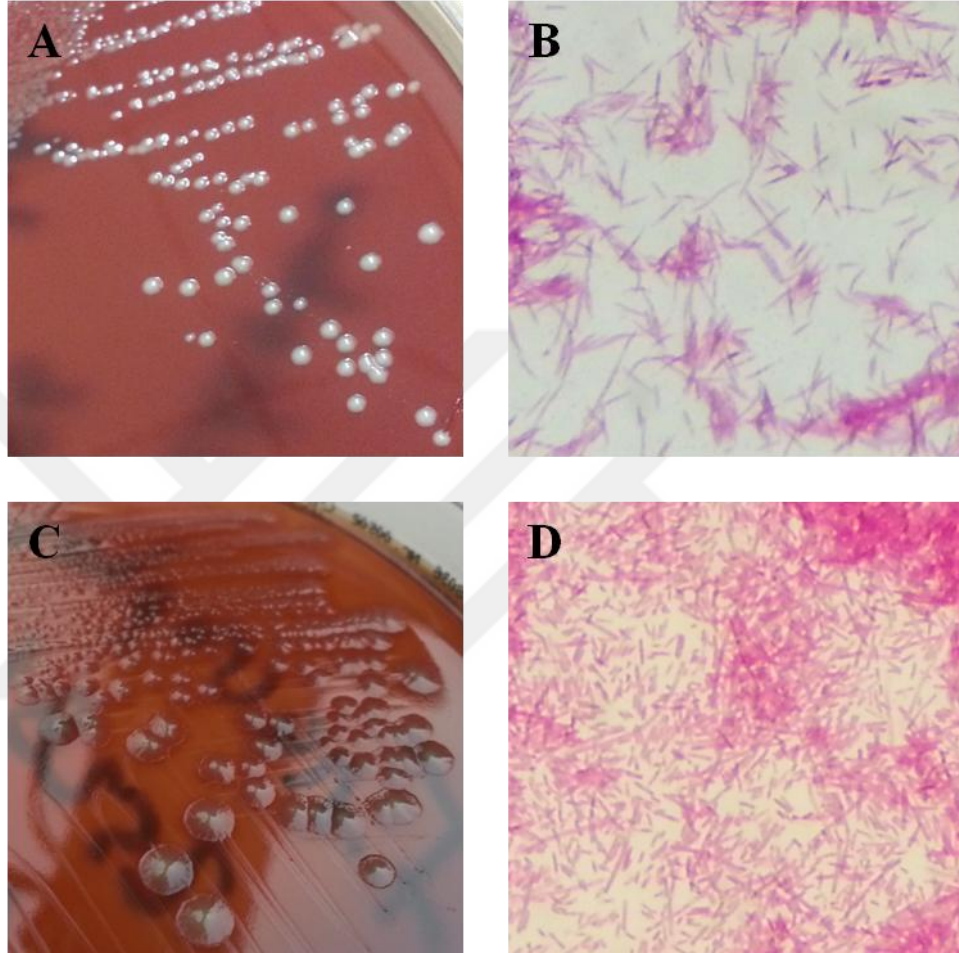
Prevotella cinsine ait türlerin çoğu neomisin (1000 µg), rifampisin (15 µg) ve kanamisin (1000 µg) disklerine karşı duyarlıdır. Birçok suş benzilpenisilin'e duyarlıdır, ancak bazı türlerin suşları β-laktamaz üretimi sonucu direnç geliştirmiştir (Tunçkanat, 2008b; Shah ve ark., 2010).

2.10. *Fusobacterium* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Fusobacterium cinsi değişik morfolojideki hareketsiz, sporsuz, düz, kokobasil ya da fusiform görünümlü anaerob Gram negatif basillerdir. Yaklaşık olarak 13 *Fusobacterium* türü vardır, ancak klinik olarak, en önemli *Fusobacterium* türleri *F. nucleatum* ve *F. necrophorum*'dur. *F. nucleatum*, ince, uzun iğ şeklinde fusiform bir basildir. Anaerob kanlı agarda ekmek kıvrıntısı görünümünde, 1-2 mm. çapında, hafif konveks, düzensiz kenarlı, üzeri benekli beyaz, sarı-gri renkli koloniler yaparlar. *F. necrophorum* ise yuvarlak uçlu, pleomorfik basiller halinde gözüktür. Anaerob kanlı agarda göbekli koloniler yapar ve hemolitik aktivite nedeni ile yeşilimsi bir renk oluşturur (Resim 2.3) (Staley ve Whitman, 2010).

Fusobacterium cinsinin vankomisine (5µg) dirençli, kolistin (10µg) ve kanamisine (1000µg) ise duyarlı olmaları ve ayrıca ana metabolik ürünlerinin bütirik asit olma özellikleriyle diğer anaerob Gram negatif basillerden ayırt edilirler. Ağız, üst solunum yolları, GİS ve genito-üriner sistem florasında bulunur ve çeşitli enfeksiyonlardan izole edilirler (Tunçkanat, 2008b). *F. nucleatum* sıklıkla peri-implantit, kök kanal enfeksiyonları, dentoalveoler apseler ve yayılan odontojenik enfeksiyonlarda önemli bir patojen olarak kabul edilir. Aynı zamanda plöropulmoner enfeksiyonlar, beyin apseleri, kronik sinüzit, bakteriyemi, metastatik osteomyelit, septik artritis, karaciğer apsesi ve diğer intra-abdominal enfeksiyonlarda da etken olabilmektedir (KÖnÖnen ve ark., 2015). Son çalışmalarda kolorektal kanser oluşumu ile ilişkisi olduğu öne sürülmüştür (Abed ve ark., 2017). *F. necrophorum* oldukça virülan, Lemierre hastalığı adı verilen

komplike bir enfeksiyona ilerleyebilen ağır baş ve boyun enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra bademcik iltihabı, peritonsiller apse, mediastinit, mastoidit, sinüzit, menenjit ve odontojenik enfeksiyonlarda da etken olmaktadır (KÖnÖnen ve ark., 2015).

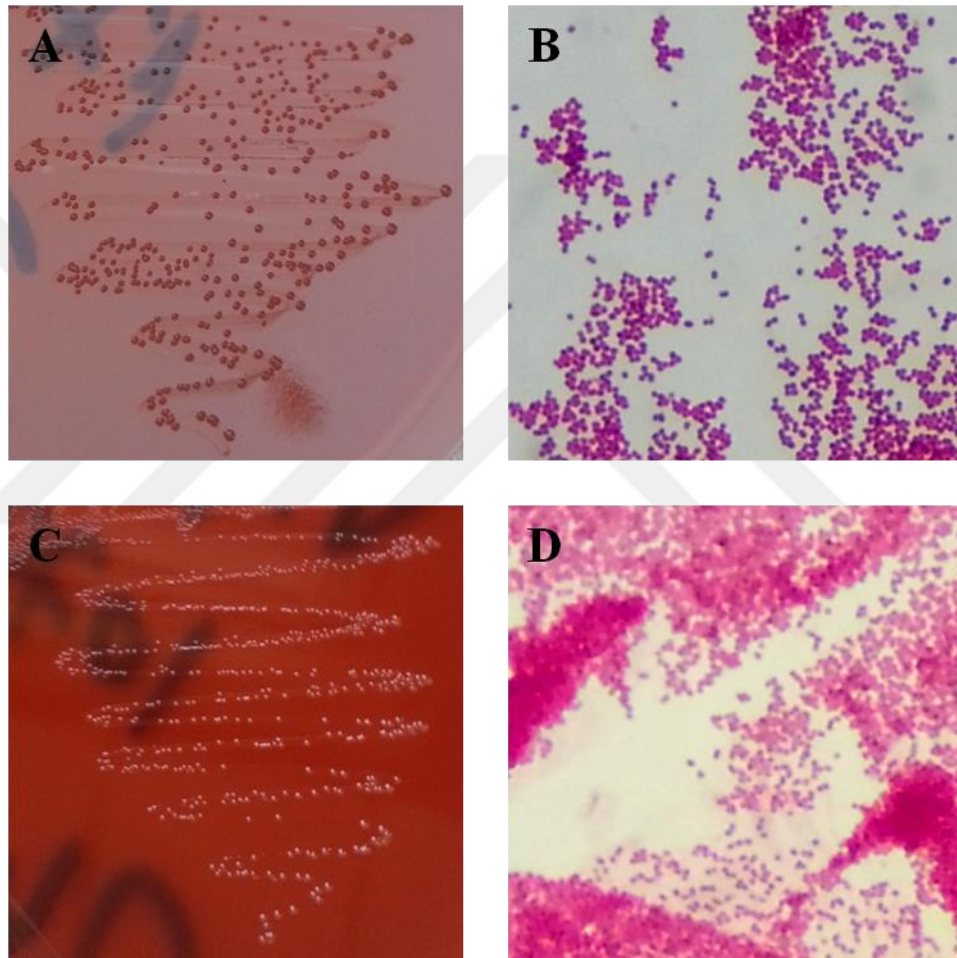


Resim 2.3. *Fusobacterium* cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri (Orijinal). **A**, *F. nucleatum* kolonisi; **B**, *F. nucleatum* Gram boyaması; **C**, *F. necrophorum* kolonisi; **D**, *F. necrophorum* Gram boyaması.

Fusobacterium'ların büyük bir kısmı penisilinlere duyarlı olmasına rağmen giderek artan oranlarda β -laktamaz yapımı bildirilmeye başlanmıştır. Birçok suşu makrolidlere karşı dirençlidir. *F. mortiferum* ve *F. varium* suşları amoksisilin-klavulanik aside dirençli oldukları ve birçok *Fusobacterium* suşunda tetrasiklin ve klindamisine giderek artan direnç oranları olduğu bildirilmektedir (Tunçkanat, 2008b; Brook, 2017).

2.11. *Veillonella* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Veillonella cinsi diplokok halinde veya kısa zincirli görünen anaerob Gram negatif koklardır. Sporsuz, hareketsiz, bazı türleri katalaz pozitifdir, tüm suşlar nitratları nitritlere indirgerler. Oksidaz ve üreaz oluşturmazlar. Kanlı agardaki kolonileri hemolizsiz, yuvarlak, pürüzsüz, 1-3 mm çapında opak gri-beyazdır (Resim 2.4). *Veillonella*'lar koyun veya at kanı içeren beyin kalp infüzyon agar (BHI) üzerinde, UV ışığı altında pembe ile kırmızı renkte floresans verirler (Rainey, 2009).



Resim 2.4. *Veillonella* cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri (Orijinal). **A**, *V. atypica* kolonisi; **B**, *V. atypica* Gram boyaması; **C**, *V. parvula* kolonisi; **D**, *V. parvula* Gram boyaması.

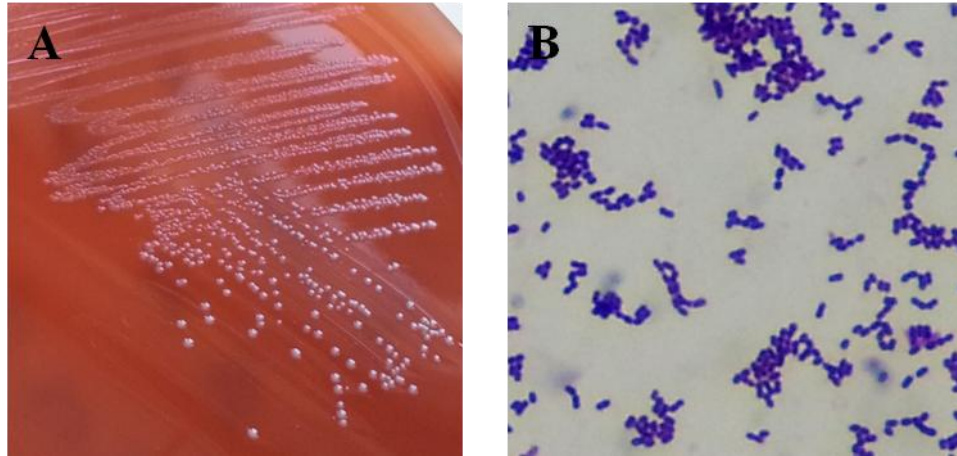
Veillonella türleri insanlarda ağız boşluğunun, ürogenital, üst solunum ve gastrointestinal sistemlerinin normal floralarının bir parçasıdır. Ağız florasında en yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar. *Veillonella* genellikle karışık bir kültürün parçası olan enfeksiyon yerlerinden izole edilmiştir. Bilinen 13 türden sadece *V. alcalescens*, *V. parvula*, *V. dispar*, *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. rogosae* ve *V. tobetsuensis* insanlardan

izole edilmiştir. *Veillonella* genellikle miks enfeksiyonlarda etken olarak izole edilmiştir. *Veillonella* enfeksiyonu için risk faktörleri periodontal hastalık, immün yetmezlik, intravenöz ilaç kullanımı ve erken doğumdur. *Veillonella* nadiren menenjit, osteomyelit, protez enfeksiyonu, eklem enfeksiyonu, plöropulmoner enfeksiyon, bakteriyemi ve endokardit gibi enfeksiyonlarda tek başına etken olabilir.

Veillonella türleri tetrasiklin, eritromisin, gentamisin, vankomisin, ramoplanin, trimetoprim sülfametoksazol ve kanamisine direnç gösterirken penisilin G, sefalotin ve klindamisine karşı duyarlıdırlar. Ayrıca kloramfenikol ve linkomisine karşı orta direnç gösterirler (Rainey, 2009; Song ve Finegold, 2015).

2.12. *Peptostreptococcus* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Peptostreptococcus cinsi zorunlu anaerob sporsuz Gram pozitif zincirli koktur. Saf kültürlerin Gram boyalı preparatlarında, hücreler çiftler halinde, kısa zincirler, dörtlüler, küçük kümeler şeklinde görülebilir. Anaerob kanlı agarda kolonileri hafif kabarık, yuvarlak, gri-beyaz renktedir (Resim 2.5). *Peptostreptococcus* türleri %5 sodyum polietanol sülfonata (SPS) >12mm çapında duyarlılık göstermeleriyle diğer Gram pozitif anaerobik koklardan (GPAK) ayırt edilirler (Song ve Finegold, 2015).



Resim 2.5. *Peptostreptococcus* cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri (Orijinal).
A, *P. anaerobius* kolonisi; B, *P. anaerobius* Gram boyaması.

Peptostreptococcus cinsi, moleküler yöntemlerle yapılan son çalışmalarla elde edilen veriler sonucunda kapsamlı taksonomik değişikliklere ve ayrıca yeni cins ve türlerin tanımlanmasına yol açmıştır. Bu cins içerisinde *P. anaerobius*, *P. stomatis* ve *P. russellii* bulunmaktadır. *P. anaerobius* ve *P. stomatis* türleri insandan izole edilen

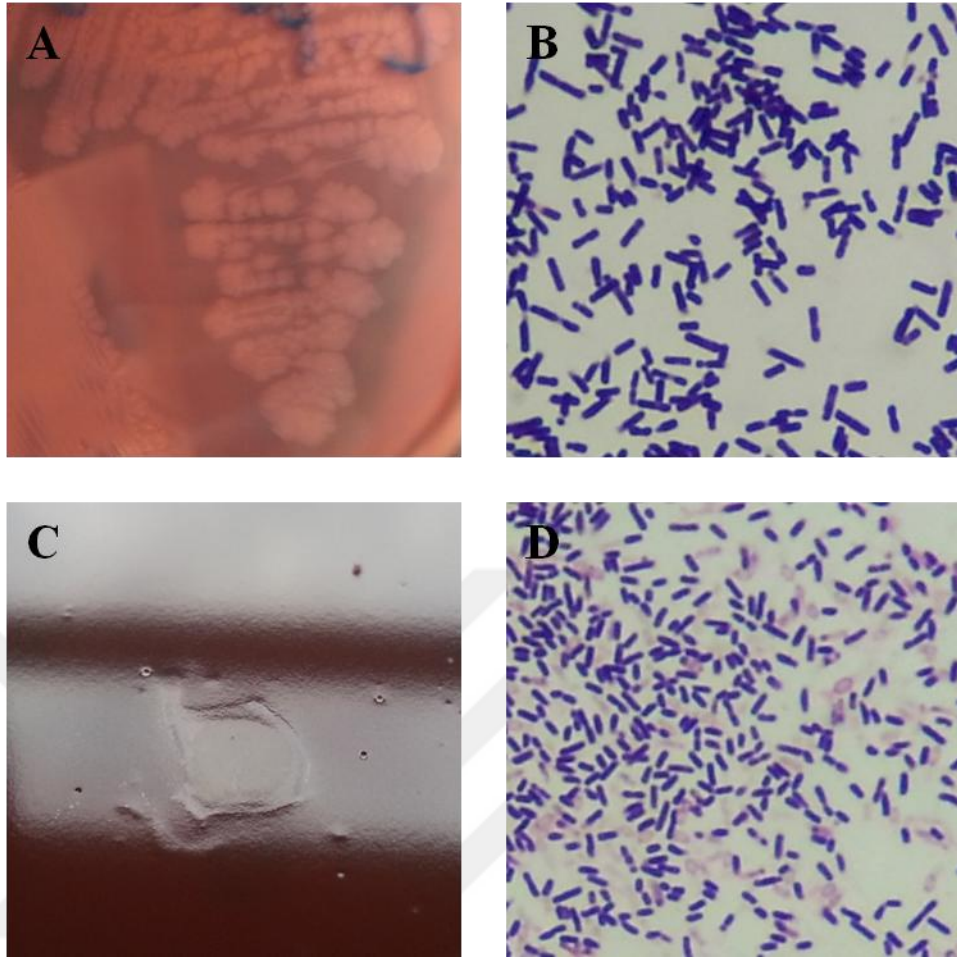
sadece iki türdür. *Peptostreptococcus* cinsi içerisindeki birçok tür *Anaerococcus*, *Finegoldia*, *Parvimonas* ve *Peptoniphilus* gibi yeni cinslere dahil edilmiştir (Murphy ve Frick, 2013; Song ve Finegold, 2015).

Peptostreptococcus cinsi insanlarda genitoüriner ve gastrointestinal sistemlerin normal florasında bulunurlar. Genellikle başka mikroorganizmalarla birlikte miks enfeksiyonlardan izole edilmesine rağmen tek başına etken olduğu enfeksiyon olguları vardır. Baş, oral, solunum yolu, gastrointestinal sistem, genitoüriner sistem, cilt ve yumuşak doku, kemik ve eklemler ve kardiyovasküler bölgeler dahil olmak üzere, vücudun her tarafında çeşitli enfeksiyon türlerine dahil olduğu konusunda raporlar vardır (Song ve Finegold, 2015).

Peptostreptococcus türleri klindamisine direnç gösterirken β -laktamlara ve β -laktamaz inhibitörlerine, sefalosporinlere, karbapenemlere ve kloramfenikole karşı duyarlıdır (KÖnÖnen, 2015; Song ve Finegold, 2015).

2.13. *Clostridium* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Clostridium cinsi endospor oluşturan, zorunlu anaerob veya aerotoleran, Gram pozitif basiller yer alır. *Clostridium* türleri pleomorfik bakterilerdir. Bazen saf kültürden hazırlanan preparatlarda; aynı anda hem Gram negatif, hem Gram pozitif boyanmış basil ve kokobasilden uzun filamentöz şekillere kadar değişebilen karışık bakteriler halinde görülebilirler (Resim 2.6). *C. ramosum*, *C. innocuum*, *C. clostridioforme* ve *C. hathewayi* Gram negatif boyanabilirler. Ancak vankomisin-kolistin disk testinde vankomisine duyarlı, kolistine dirençlidirler. *C. perfringens*, *C. ramosum* ve *C. innocuum* dışındaki tüm türler hareket etme yeteneğine sahiptirler. *Clostridium* cinsi içinde yer alan türlerden sadece *C. perfringens* ve *C. butyricum* kapsüllüdür. *Clostridium* türleri sporlu bakterilerdir. Spor oval veya yuvarlak biçimde, terminal, subterminal veya santral yerleşimli olabilir. *C. perfringens*, *C. clostridioforme* ve *C. ramosum* dışındaki türlerde sporun çapı, basil bedeninden daha geniş olduğu için kolaylıkla fark edilebilir. *Clostridium* türlerinde genellikle katalaz, sitokrom oksidaz ve süperoksit dismutaz negatif olsa da, *C. perfringens* gibi bazı suşlarda bu enzim aktivitelerinin bazıları eser miktarda olabilir (Kıyan, 2008; Stevens ve ark., 2015).



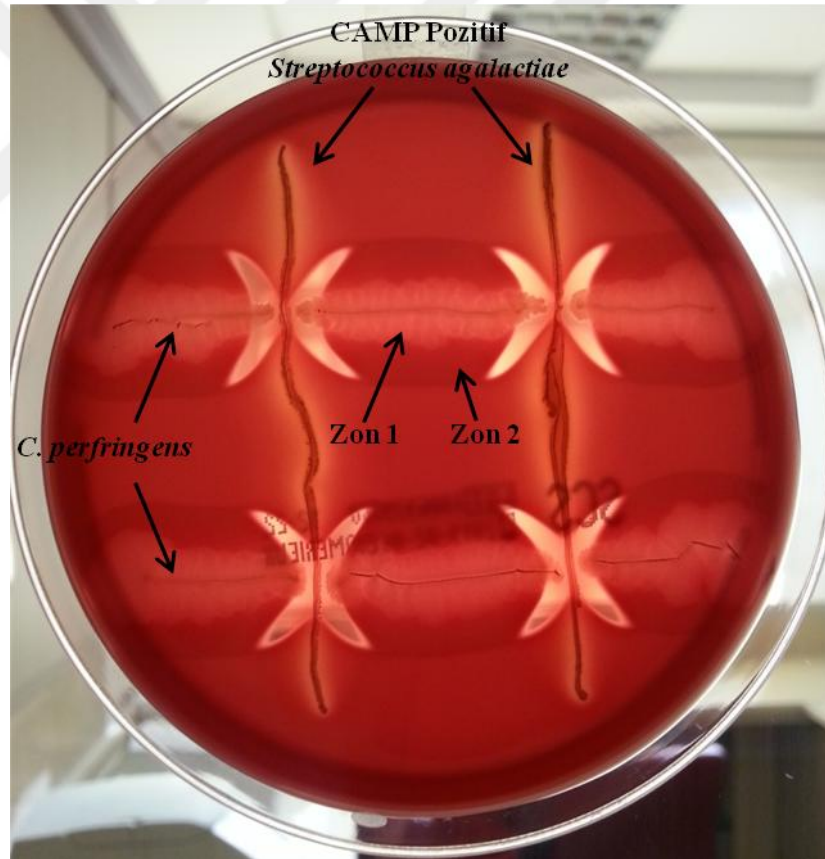
Resim 2.6. *Clostridium* cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri (Orijinal). **A**, *C. perfringens* kolonisi; **B**, *C. perfringens* Gram boyaması; **C**, *C. septicum* kolonisi; **D**, *C. septicum* Gram boyaması.

Clostridium'lar anaerob kanlı agarda genellikle düz, ortası hafif kabarık, R tipine benzer etrafında çıkıntılar olan, *C. septicum* ve *C. tetani* gibi bazıları yayılma özelliği gösteren (swarming) karakteristik koloniler oluştururlar. Anaerob kanlı agarda *C. perfringens*, çift zonlu hemolizi olan kenarları çıkıntılı büyük koloniler, *C. botulinum* irregüler, büyük, düz, bazen yayılabilen koloniler ve *C. difficile* ise nonhemolitik, 2-4 mm çaplı, irregüler, krem-gri beyaz arası koloniler oluştururlar. *C. perfringens*, kanlı agarda ters CAMP yapma özelliği ile diğerlerinden ayrılır (Resim 2.7) (Doluca, 2011; Stevens ve ark., 2015).

Clostridia sınıfı, virülans ile ilgili ekstrasellüler proteinlerin yanında tabiatta bilinen botulinum nörotoksini, tetanoz nörotoksini ve *C. perfringens* epsilon toksini gibi en ölümcül ekzotoksinlerin de içinde bulunduğu yirmiden fazla farklı toksin sentezleyebilen en geniş çeşitliliğe sahip bakteri genusuna sahiptir. Şu an 200'den fazla

clostridial tür ve alttür bilinmektedir, ancak insan enfeksiyonlarından kaynaklanan klinik olarak anlamlı *Clostridium* sayısı sınırlıdır. (Stevens ve ark., 2015)

Clostridia, insanlarda ağız mukozasında, bağırsak ve kadın genitoüriner sistemlerinin normal florasında çok sayıda bulunurlar. Klinik olarak en önemli türleri *C. tetani* tetanoza, *C. botulinum* botulizme, *C. perfringens* gazlı gangrene ve besin zehirlenmesine, *C. difficile* psödomembranöz kolite neden olurken, diğer taraftan florada yer alan türlere bağlı endojen enfeksiyonlar da sıklıkla bildirilmektedir. *Clostridium* türlerine bağlı, baş boyun enfeksiyonları, sinüzit, beyin apsesi, akciğer apsesi, plevral ampiyem, kolesistit, bakteriyemi, septik artrit aspirasyon pnömonisi, batin içi ve jinekolojik enfeksiyonlar, kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları bildirilmektedir (Doluca, 2011; Stevens ve ark., 2015).



Resim 2.7. *C. perfringens* ters CAMP ve çift zon hemoliz görünümü (Orişinal).

Clostridium'lar imipenem, metronidazol, vankomisin, kloramfenikol, β -laktamların β -laktam inhibitörleri (örneğin, ampisilin-sulbaktam) ile kombinasyonlarına duyarlıyken, *C. perfringens* dışındaki pek çok clostridia sefoksitin, sefotaksim, seftazidim,

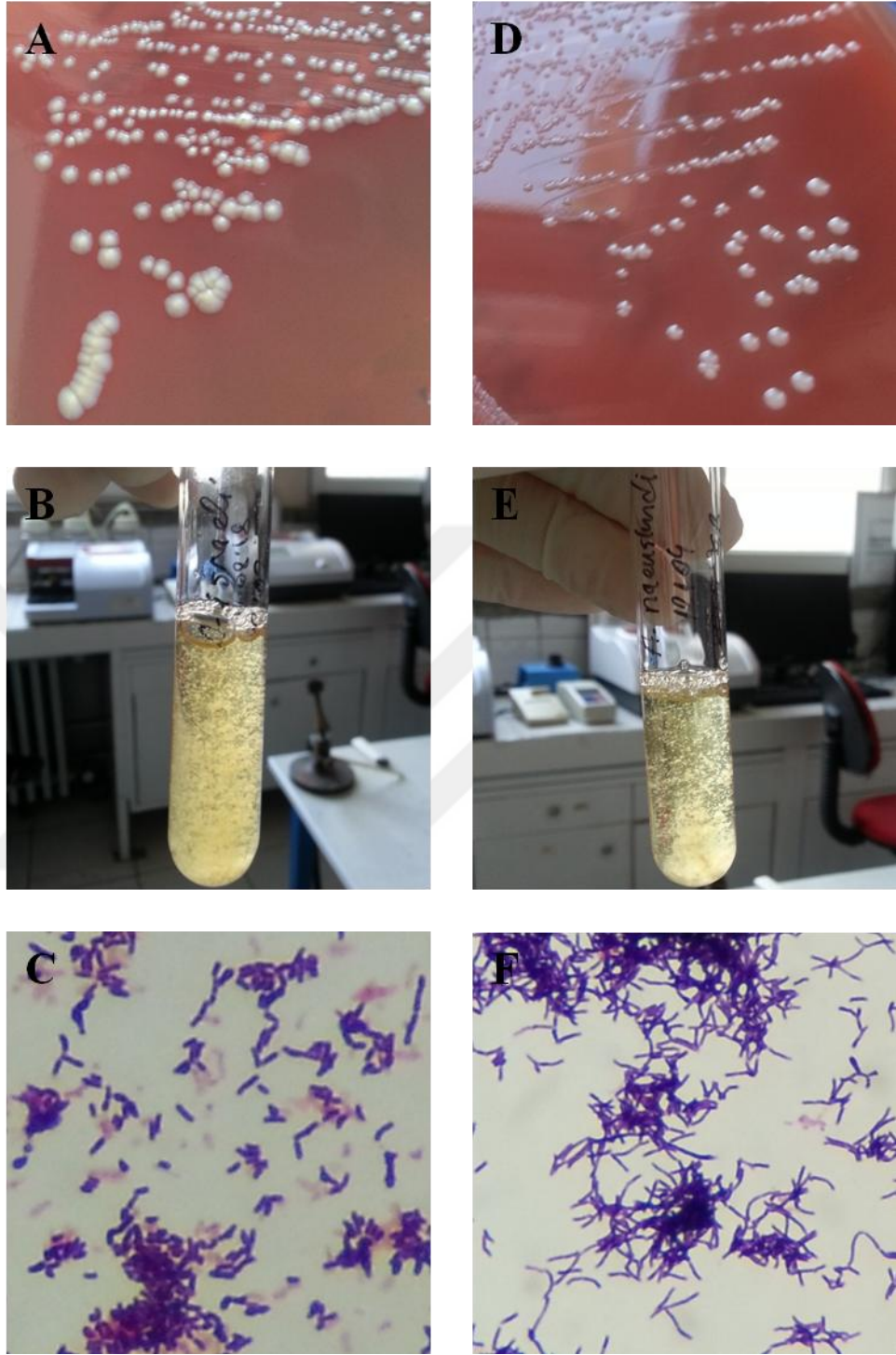
seftizoksım, sefoperazon ve diğer geniş spektrumlu β -laktamlara dirençlidir (Stevens ve ark., 2015).

2.14. *Actinomyces* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Actinomyces türleri, Gram pozitif, basil, kokobasil, difteroid çomak ve filamentöz yapıya sahip, çoğu fakültatif bazıları ise zorunlu anaerob olan bakterilerdir. *Actinomyces*'ler aside dayanıksız, hareketsiz, spor ve konidyumları olmayan türlerdir. Katı besiyerindeki koloni şekli beyaz, gri-beyaz veya kremi beyaz azı diş şeklinde, sıvı besiyerindeki üreme şekli ise ekmek kırıntısı görünümündedir (Resim 2.8). Büyüme ortamında %5-10 oranında karbondioksit bulunması üremeyi artırır (Funke, 2010).

Actinomyces cinsi 41 türden oluşur ve bunların 24'ü insandan izole edilmiştir (Hall ve Copsey, 2015). İnsanlarda çoğunluğu ağız florasında olmak üzere bağırsak ve kadın genital sistemlerinin normal florasında bulunurlar (Funke, 2010). Aktinomikozu neden olan *Actinomyces* türleri aynı zamanda diğer bakteri grupları ile birlikte diş ve ağız, servikofasiyal, solunum yolu, deri ve yumuşak doku, bakteriyemi, endokardit, abdominal ve genital enfeksiyonlara yol açmaktadırlar (Hall ve Copsey, 2015). Hasta örneklerinden yapılan direk Gram boyamalarda Gram pozitif dallanan çomak yapısı ve sülfür granüllerinin görülmesi *Actinomyces*'ler için karakteristiktir. Gram boyamada *Actinomyces*'lerin *Nocardia* türlerinden ayırımı zordur. *Nocardia*'lar, aerob olma ve modifiye EZN yöntemiyle boyanabilme özellikleriyle *Actinomyces*'lerden ayrılırlar (Ülger, 2011).

Actinomyces'ler, β -laktam grubu antibiyotiklere karşı oldukça hassastır ve tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler, linkomisin, fusidik asit ve vankomisine karşı yüksek ve orta derecede duyarlılığa sahiptirler. Genel olarak aminoglikozitlere ve metronidazole karşı dirençlidirler (Funke, 2010). Türlerin çoğu neomisine duyarlı olduğu için neomisinli besiyerinin kullanılmasından kaçınmak gerekir (Ülger, 2011).



Resim 2.8. *Actinomyces* cinsine ait koloni ve Gram boyama görüntüleri (Orijinal).
A, *A. israelii* kolonisi; **B,** *A. israelii* sıvı besiyerinde üremesi; **C,** *A. israelii* Gram boyaması; **D,** *A. naeslundii* kolonisi; **E,** *A. naeslundii* sıvı besiyerinde üremesi; **F,** *A. naeslundii* Gram boyaması.

2.15. Anaerob Kültür için Klinik Örneklerin Toplanması, Nakli ve İşlenmesi

Normal floradaki anaerob bakterilerin kontaminasyonundan kaçınarak örneklerin uygun şekilde alınması çok önemlidir. Anaerobik enfeksiyonun tanımlanabilmesi için uygun örneklerin uygun şekilde toplanması, laboratuvara hızlı transferi ve laboratuvarında uygun şekilde işleme alınması gerekir. Yetersiz teknikler veya ortam, anaerobik bakterilerin tanımlanamamasına neden olur (Hall ve Holden, 2016; Brook, 2017).

2.15.1. Örneklerin Toplanması

Genel olarak mukozalardan veya deriden örnek alınırken yüzeyin dekontaminasyon işlemi yapılmalıdır. Bu amaçla bölge öncelikle cerrahi sabun ile temizlenir daha sonra %70 alkol uygulanır, en son olarak 1 dakika %10 povidon iyot ile dekontaminasyon işlemi tamamlanır. Anaerobik kültür için örnekler, enfeksiyon bölgesinden, normal flora ile kontamine edilmeden, steril bir teknikle alınan örneklerdir. Anaerobik kültür için en uygun örnekler, enjektör ve benzeri aletler kullanılarak alınan aspiratlar, steril vücut sıvıları, doku veya biyopsi örnekleridir (Hall ve Holden, 2016; Procop ve ark., 2017). Normal mikrobiyal flora ile kontamine olma riski, alınan örneklerin az materyal içermesi gibi nedenlerle eküvyon çubuğu ile örnek alımı önerilmemektedir. Örnek alınırken ve taşınırken oksijen ile teması engellemek için önlem alınmalıdır (Procop ve ark., 2017; Tille, 2017). Anaerob kültür için uygun olan ve olmayan örnekler Tablo 2.8'de gösterilmiştir (Hall ve Holden, 2016).

2.15.2. Örneklerin Nakli

Laboratuvara nakil süresi örneğin hacmine ve cinsine bağlıdır. Büyük hacimli pürülan örnekler ve büyük doku parçaları anaerobların canlılıklarını saatlerce koruyabilir. Gerekli durumlarda eküvyonla alınmış örnekler, küçük hacimli aspirasyon örnekleri, biyopsi veya kazıntı materyalleri anaerobik ortam sağlayan transport sistemiyle nakledilmeleri gerekir. İğne batma riski ve dışarıya sızma ihtimali nedeniyle enjektörle transport risklidir.

İşlemde gecikme olması durumunda, örnekler işleme alınıncaya kadar oda sıcaklığında bekletilmelidir, aşırı sıcak veya soğuk ortamda bekletilmemelidir (Hall ve Holden, 2016).

Tablo 2.8. Anaerob kültür için uygun olan ve olmayan örnekler (Hall ve Holden, 2016).

Alınan yer	Kabul edilebilir örnekler	Kabul edilemez örnekler
Baş ve boyun	Cerrahi olarak alınan biyopsi örneği Yüzey dekontaminasyonundan sonra enjektör ile alınan apse aspiratı	Boğaz veya nazofaringeal sürüntüler Gingival sürüntüler Eküvyon ile alınan yüzeysel örnek
Akciğerler	Transtrokeal aspirat Perkutanöz yolla akciğerden alınan örnek Cerrahi olarak alınan biyopsi örneği Korunmalı fırça ile alınan bronkoskopi Torakotomi örneği	Öksürtülerek alınan balgam Uyarılarak alınan balgam Endotrakeal aspirat Özel olarak alınmamış bronkoskopik örnekler
Santral sinir	İğne ve enjektör ile alınan apse aspiratı Cerrahi olarak alınan biyopsi örneği	Aerobik sürüntüler
Karın	İğne ve enjektör ile alınan peritoneal sıvı İğne ve enjektör ile alınan apse aspiratı Safrası Cerrahi olarak alınan biyopsi örneği	Aerobik sürüntüler
Üriner sistem	Suprapubik aspirat	Boşaltılmış idrar Sondadan alınan idrar
Kadın genital sistemi	Koldoskopi örnekleri Vakum ile veya korunmalı kolektör ile alınmış endometrial aspirat İğne ve enjektör ile alınan apse aspiratı Cerrahi olarak alınan biyopsi örneği <i>Actinomyces</i> türleri için IUD ^a	Vajinal veya servikal sürüntüler
Kemik ve eklem	İğne ve enjektör ile alınan aspirat Cerrahi olarak alınan biyopsi örneği	Eküvyon ile alınan yüzeysel örnek
Yumuşak doku	İğne ve enjektör ile alınan aspirat Cerrahi olarak alınan biyopsi örneği İğne ve küçük plastik kateter ile sinüs bölgesinden alınan aspirat Dekontamine derideki açık yara kenarından alınan derin aspirat Dekontamine derideki yüzeysel ülserden alınan derin aspirat	Deri yüzeyi ve yara kenarlarından alınan yüzeysel örnek

^a IUD, Intrauterine device

2.15.3. Anaerobik Kültür için Örneklerin İşlenmesi

2.15.3.1. Makroskopik İnceleme

Örneğin makroskopik incelenmesi örneğin cinsi, kalitesi ve anaerobların bulunup bulunmadığı hakkında bilgi verebilir. Örnekte kan, irin, nekrotik doku, hoş olmayan koku, gaz ve sülfür granüllerinin bulunması değerlendirmede dikkat edilmesi gereken özelliklerdir. Ayrıca örneklerin UV ışığında tuğla kırmızısı renginde floresans vermesi örnekte pigmentli anaerob bakterilerin (pigmentli *Prevotella* veya *Porphyromonas* spp.) olduğunu düşündürür. (Hall ve Holden, 2016; Procop ve ark., 2017; Tille, 2017).

2.15.3.2. Örneğin Hazırlanması

İrinli örnekler bakterilerin homojen olarak dağılması için vortekslenir. Doku veya kemikler 1 ml sıvı besiyeri (Tiyoglikolat, kıymalı buyyon vb.) içerisinde parçalanarak homojenize edilir. İrinsiz büyük hacimli örnekler santrifüj edilerek yoğunlaştırılmalıdır. Eküvyonla alınmış örneklerin pamuklu uç kısmı 0.5 ml sıvı besiyeri içine aktararak sıvı bir örnek gibi işleme alınır (Hall ve Holden, 2016).

2.15.3.3. Gram Yöntemiyle Boyama

Gram yöntemiyle boyama, mikroorganizmaların göreceli olarak sayılarını ve tiplerini ve konağa ait hücreleri gösterir. Buna göre bakterilerin Gram negatif veya pozitif, kokçomak şeklinde oldukları, spor oluşturup oluşturmadıkları saptanır. Ayrıca anaerobik tekniklerin yeterliliği için bir kalite kontrol önlemi olarak yardımcı olur. Gram boyamada elde edilen bakteri morfolojisi ile örnek tipi arasındaki korelasyon, klinisyenin, etken bakteri hakkında tahmini bilgi edinmesini sağlayabilir.

Örneğin lam üzerine yayması yapılır ve hafifçe ısıtılarak ya da saf metanol içinde 1 dakika bekletilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilir. Daha sonra standart Gram boyama usulü ve reaktifleri kullanılarak preparat boyanır. Alternatif olarak, bazı Gram negatif anaerobların boyanmasını artırmak için safranin yerine bazik fuksin tercih edilebilir.

Gram boyama yöntemi sonucuna göre klinisyeni yönlendiren bazı önemli ipuçları şunlardır (Hall ve Holden, 2016);

- Sporsuz, vagon şeklinde büyük gram pozitif çomaklar genellikle *C. perfringens*'i gösterir.

- Gram negatif kokobasil yapısındaki bakteriler pigment yapan *Prevotella* veya *Porphyromonas* türlerini akla getirirler.
- Mekik şeklinde, sivri uçlu, ince Gram negatif basiller *F. nucleatum*'u akla getirirler.
- Pleomorfik, soluk boyanan Gram negatif basil ve kokobasiller *Bacteroides* türlerini akla getirirler.
- Çok küçük Gram negatif koklar *Veillonella* türlerini akla getirirler.

2.16. Besiyeri Seçimi

Besiyerleri, klinik olarak önemli anaerobların ihtiyaç duyduğu uygun besinleri ve takviyeleri içermelidir. Anaerob bakterilerin çok çeşitli beslenme ihtiyaçları vardır, ancak primer izolasyon için besiyerine hemin, L-sistein ve K1 vitamini ilave edilmesi gerekir. Anaerob bakterilerin izolasyonu için seçici ve seçici olmayan genel üretim besiyerleri kullanılır (Hall ve Mangels, 2016b; Procop ve ark., 2017). Bu besiyerleri Tablo 2.9'da listelenmiştir.

Tablo 2.9. Anaerob bakteri izolasyonunda kullanılan besiyerleri (Hall ve Mangels, 2016b; Procop ve ark., 2017; Tille, 2017).

Primer İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri		Spesifik Anaerobların İzolasyonunda Kullanılan Özel Besiyerleri
Seçici Olmayan Besiyerleri	Seçici Besiyerleri	
Beyin kalp infusion kanlı agar	KVLB	Neomisinli anaerob kanlı agar
Brucella kanlı agar	PVLB	Forget-Fredette Agar
CDC anaerob agar	PEA	Hartley's digest broth
Colombia kanlı agar	BBE	Lombard Dowell Agar
Trypticase soy kanlı agar	CCFA	Triptoz-sülfid-sikloserin agar
Schaedler kanlı agar	EYA	Wilkins-Chalgren anaerob broth
Kıyılmalı karbonhidrat broth		<i>Fusobacterium</i> selective agar
Kıyılmalı glikoz broth		<i>Fusobacterium necrophorum</i> selective agar
Tiyoglikolatlı buyyon		Yumurta sarılı McClung-Toabe agar
PYG		Shahidi-Ferguson perfringens agar

BBE, *Bacteroides* safra eskulin agar; **CCFA**, Sikloserin sefoksitin fruktoz agar; **CDC**, Centre of Disease Control; **EYA**, Yumurta sarılı agar; **KVLB**, Kanamisin vankomisin kanlı agar; **PEA**, Feniletıl alkol kanlı agar; **PVLB**, Paromomisin vankomisin kanlı agar; **PYG**, Pepton maya özütü glikoz broth.

Anaerob bakteri kültürü için kullanılacak besiyeri taze hazırlanmalı ve kullanılmadan önce oda ısısında bekletilmelidir. Oksijen düşük ısılarda besiyerine daha iyi difüze olacağından, buzdolabında bekletilen besiyerlerinde anaerob bakterilerin izole edilebilmesi mümkün değildir (Gürler, 2011).

Anaerobların izolasyonunda kullanılan seçici ve özel besiyerlerinin kullanım amaçları şu şekildedir (Gürler, 2011; Hall ve Mangels, 2016b; Procop ve ark., 2017; Tille, 2017);

Kanamisin vankomisin kanlı agar: Klinik örneklerden çoğu *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium* ve *Veillonella* türlerinin üremesini seçici olarak desteklerken, vankomisin (7,5 µg/ml) *Porphyromonas* türlerinin üremesini inhibe eder. *Porphyromonas* türlerinin izolasyonu için vankomisin konsantrasyonu 2 µg/ml olması gerekir.

Paromomisin vankomisin kanlı agar: Kullanım amacı KVLB besiyeri ile aynıdır, laboratuvarında sadece biri kullanılır.

Feniletıl alkol kanlı agar: Çoğu Gram pozitif ve Gram negatif zorunlu anaerobların üremesini destekler. Anaerobları baskılayabilen enterik ve diğer fakültatif anaerob Gram-negatif basillerin üremesini ve *Proteus*'un yayılmasını inhibe eder. Ayrıca belirli *Clostridium*'ların yayılmasını inhibe eder.

***Bacteroides* safra eskulin agar:** *Bacteroides fragilis* grubunun ve *Bilophila wadsworthia*'nın ayırımı ve identifikasyonu için kullanılır

Sikloserin sefoksitin fruktoz agar: *Clostridium difficile*'nin identifikasyonu için kullanılır.

Yumurta sarılı agar: *Clostridium* spp.'den şüphelenildiğinde veya anaerobik bir izolatın tanımlanabilmesi için proteolitik enzimlerin (lesitinaz veya lipaz) araştırılması gerekli ise bu besiyeri kullanılır.

Neomisinli anaerob kanlı agar: Neomisin, çoğu *Staphylococcus aureus* suşunu ve Enterobacteriaceae'nin çoğunu inhibe eder

Forget–Fredette agar: *Clostridium*'ların üretilmesinde kullanılır.

Hartley's digest broth: *Actinomyces*'lerin üretilmesinde kullanılır.

Lombard Dowell agar: Çoğu anaerobun izolasyonunda kullanılır.

Triptoz-sülfite-sikloserin agar: *C. perfringens*'in izolasyonu ve kültürü için kullanılır.

Wilkins-Chalgren anaerob broth: Çoğu anaerobun ekiminde ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılır.

***Fusobacterium* selective agar:** *Fusobacterium* spp. hariç, diğer birçok Gram negatif ve Gram pozitif aerob ve anaerob bakterilerin üremesini inhibe etmede kullanılır.

***Fusobacterium necrophorum* selective agar:** Birçok Gram negatif ve Gram pozitif aerob ve anaerob bakterilerin üremesini inhibe ederken, Lemierre hastalığından şüphelenildiğinde boğaz ve diğer solunum örneklerinden *F. necrophorum*'un izolasyonu için kullanılır.

Yumurta sarılı McClung-Toabe agar: *C. perfringens*'in izolasyonu ve kültürü için kullanılır.

Shahidi-Ferguson perfringens agar: *C. perfringens*'in izolasyonu ve sayımı için kullanılır; bir çökelti ile çevrili siyah koloniler olarak görünürler.

2.17. Besiyerine İnokülasyon

Hazırlanan örneklerden uygun aerobik ve anaerobik katı/sıvı besiyerlerine ekim yapılır ve Gram yöntemiyle boyama için lam üzerine yayma yapılır. Katı besiyerlerine irinli örnekten 1 damla, irinli olmayan örnekten 2-3 damla, sıvı besiyerlerine ise 0,5-1 ml aktarılır. Eküvyon çubuğu ile gelen örnekler, önce seçici olmayan besiyerine ekilir. İki Eküvyon varsa, biri besiyerine ekim için, diğeri ise Gram boyama preparatı hazırlanması için kullanılır (Hall ve Holden, 2016).

2.18. Anaerob Bakterilerin İnkübasyon Şartları ve İnkübasyon Sistemleri

Anaerob bakterilerin primer izolasyonu için en uygun ısı 35°C ile 37°C'dir. Clostridial myonekroz kuşkusu yoksa besiyeri en az 48 saat inkübe edilmelidir. Anaerobların oksijene en duyarlı oldukları dönem üremenin logaritmik fazı olduğu için 48 saatten önce oksijene temas etmemelidirler. Bu süre içerisinde üreme olmayan petriler yeniden anaerob koşullarda 7 gün daha inkübe edilmelidir. Özellikle *Porphyromonas* ve *Actinomyces* cinsleri gibi yavaş üreyen bakteriler için 48 saatlik inkübasyon yeterli değildir (Gürler, 2011; Hall ve Mangels, 2016c; Procop ve ark., 2017).

Anaerob bakterilerin izolasyonu için gerekli anaerob ortamın sağlanması için çeşitli sistemler kullanılmaktadır. Bu sistemler aşağıda özetlenmiştir.

2.18.1. Anaerobik Kabinler

Anaerob bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu işlemlerinin oksijensiz ortamda yapılmasına olanak sağlayan ideal bir kapalı sistemdir. İçine %80-90 N₂, %5 H₂, ve %5-10 CO₂ gaz karışımı verilen ve bir paladyum katalizörü (katalist) bulunduran odacık şeklindedir. Bu tip kabinlerin içinde bir pozitif basınç bulunur. Kabin içine anaerob indikatör veya biyolojik indikatör konularak sistem kontrol edilir (Hall ve Mangels, 2016c).

2.18.2. Anaerobik Poşetler

Poşet sistemleri, katalizör olmadan, üzerine su eklemeye gerek kalmadan, hidrojen açığa çıkarmaksızın havadaki oksijeni absorbe eden bir kese ile anaerobik ortamı oluşturan sistemlerdir. Bir veya iki petri bir torbaya yerleştirilir ve torba kapatılır. Bu sistem sayesinde petriler poşetten çıkarılmadan incelenerek üremenin olup olmadığı gözlemlenebilir. Bu poşetler ayrıca klinik örneklerin laboratuvara taşınması için de kullanılabilir (Hall ve Mangels, 2016c; Fader, 2019).

2.18.3. Anaerobik Kavanozlar

Anaerobik bir atmosfer oluşturmak için en yaygın kullanılan sistem anaerob kavanozudur. Bu sistemlerin tamamında, hava sızdırmaz hale getirmek için kenetlenmiş bir kapağı olan şeffaf, ağır bir plastik kavanoz kullanılır. Kavanozda anaerobik ortam oluşturmak için %80-90 N₂, %5 H₂ ve %5-10 CO₂'den oluşmuş gaz üreten bir sistem kullanılır. Anaerob kavanozlar ve ortam sağlayıcılar ticari olarak birçok şirketten temin edilebilir. Su ile aktive olan veya susuz anaerobik atmosfer sağlayan sistemleri mevcuttur. Su ile aktive olan sistemin çalışması için kavanoza katalizör konulması gereklidir (Hall ve Mangels, 2016c; Tille, 2017).

2.18.4. Anoxomat Mark II Sistemi

Anoxomat, anaerobik, mikroaerofilik ve kapnofilik bakterilerin üretilmesi için dizayn edilmiş bir cihazdır. Üzerinde bulunan valf sayesinde kavanoz içinde otomatik olarak uygun ortamı sağlayabilmektedir. Anoxomat, anaerob kavanozun boşaltılması ve dolum kontrolünü hassas basınç ölçümleri ile yapar. Cihazda yer alan bir bilgisayarla işlemler yönetilir. Kavanozdan boşaltılan havanın yerini üç farklı gazdan oluşan karışım (N₂, H₂ ve CO₂) alır (Hall ve Mangels, 2016c; Tille, 2017).

2.19. İlk Kùltürlerin Anaerob Bakteriler Yönünden İncelenmesi

İlk kùltürler işleme alınırken amaç, örnekteki klinik önemi olan anaerob organizmaları izole etmek, tanımlamak ve endikasyonu varsa antibiyotik duyarlılık testini yapmaktır. Kùltür plakları değeriendirilirken, Gram boyalı preparatta görülen tüm morfolojik yapılar ile eşleştirme yapılmalıdır. Anaerob kùltür ortamında fakùltatif anaerob bakterilerin de üreyebileceğı akıldan çıkarılmamalıdır. Tüm izolatların, anaerob olarak tanımlanabilmesi için aerotolerans testini geçmesi ve özel tanımlama antibiyotik diskleri ile ön identifikasyonunun yapılması gerekir.

Anaerob bakterilerin koloni özellikleri, pigment özellikleri ve UV ışığında floresan verme özellikleri muhtemel tanıyı belirlemede yararlıdır. Anaerob bakterilerin koloni özelliklerine göre muhtemel tanısı Tablo 2.10'da gösterilmiştir (Gürler, 2011; Hall ve Byrd, 2016; Tille, 2017).

Tablo 2.10. Anaerob bakterilerin koloni özelliklerine göre muhtemel tanısı (Gürler, 2011; Hall ve Byrd, 2016; Tille, 2017)

Koloni morfolojisi / özelliğı	Besiyeri	Muhtemel etken
Agarı çukurlaştırma	AnaBA	<i>Bacteroides ureolyticus</i> grubu
Kahverengi - siyah koloni	AnaBA	<i>Porphyromonas</i> spp., pigmentli <i>Prevotella</i> spp.
1 mm'den büyük siyah koloni	BBE	<i>Bacteroides fragilis</i>
Etrafi şeffaf ortası siyah koloni	BBE	<i>Bilophila wadsworthia</i>
Besiyerinde yeşilimsi renk	AnaBA	<i>Fusobacterium</i> spp., <i>B. ureolyticus</i>
Sarı renk buzlu cam görünümü	CCFA	<i>Clostridium difficile</i>
Pembe - kırmızı koloniler	AnaBA	Gram pozitif basil: <i>Actinomyces odontolyticus</i>
Tuğla kırmızısı floresans	AnaBA	<i>Porphyromonas</i> spp., pigmentli <i>Prevotella</i> spp.
Açık yeşil - sarı floresans	AnaBA	Gram negatif basil: <i>Fusobacterium</i> spp. Gram pozitif basil: <i>C. difficile</i> veya <i>C. innocuum</i>
Kırmızı floresans	AnaBA	<i>Veillonella</i> spp., <i>Eubacterium lentum</i>
Çift zonlu beta hemoliz	AnaBA	<i>Clostridium perfringens</i>
Sahanda yumurta görünümü	AnaBA	<i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>F. varium</i>
Büyük, düzensiz kenarlı	AnaBA	<i>Clostridium</i> spp.
Medusa başı görünümü	AnaBA	<i>Clostridium septicum</i>
Azı dişi görünümü	AnaBA	<i>Actinomyces</i> spp.
Ekmek kırıntısı görünüm	AnaBA	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Yayılan koloni	AnaBA	<i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. tetani</i>
At ahır kokusu	AnaBA	<i>C. difficile</i>
Hoş olmayan tatlı koku	AnaBA	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>

AnaBA, Anaerobik kanlı agar; **BBE**, *Bacteroides* safra eskulin agar; **CCFA**, Sikloserin sefoksitin fruktoz agar;

2.20. Anaerobların İdentifikasyonunda Kullanılan Konvansiyonel Basit Testler

2.20.1. Aerotolerans Testi

Aerotolerans testi, anaerobik koşullar altında izole edilmiş bir mikroorganizmanın zorunlu veya fakültatif bir anaerob olup olmadığını belirler. Anaerob kanlı agarda üreyen her farklı koloniden, anaerob kanlı agara ve çikolata besiyerine pasajlar yapılır. Anaerob kanlı agar besiyerleri anaerob ortamda, çikolata besiyerleri ise %5-10 karbondioksitli ortamda 48 saat inkübe edilir. Bu sürenin sonunda anaerob ortamda üreyip karbondioksitli ortamda üremeyen bakteriler zorunlu anaerob olarak kabul edilir (Fader, 2019).

2.20.2. Özel Potensli Antimikrobiyal Diskler

Tanımlama diskleri olarak kanamisin (1mg), vankomisin (5µg) ve kolistin (10µg) kullanılır (Tablo 2.11). Bu diskler Gram boyamayı desteklemeye ve ön gruplandırmaya yardımcı olur, anaerob bakterilerin antimikrobiyal duyarlılığını göstermez (Hall ve Byrd, 2016).

Tablo 2.11. Anaerob bakterilerin identifikasyonunda kullanılan antibiyotik diskleri (Hall ve Byrd, 2016).

Mikroorganizmalar	Sonuçlar ^a		
	Kanamisin 1000 µg	Vankomisin 5 µg	Kolistin 10 µg
Gram pozitif anaeroblar	V	S ^b	R
<i>Bacteroides fragilis</i> grubu ^c	R	R	R
<i>Bacteroides ureolyticus</i> grubu ^d	S	R	S
<i>Fusobacterium</i> spp.	S	R	S
<i>Porphyromonas</i> spp.	R	S ^e	R
<i>Prevotella</i> spp.	V	R	V
Gram negatif koklar	S	R	S

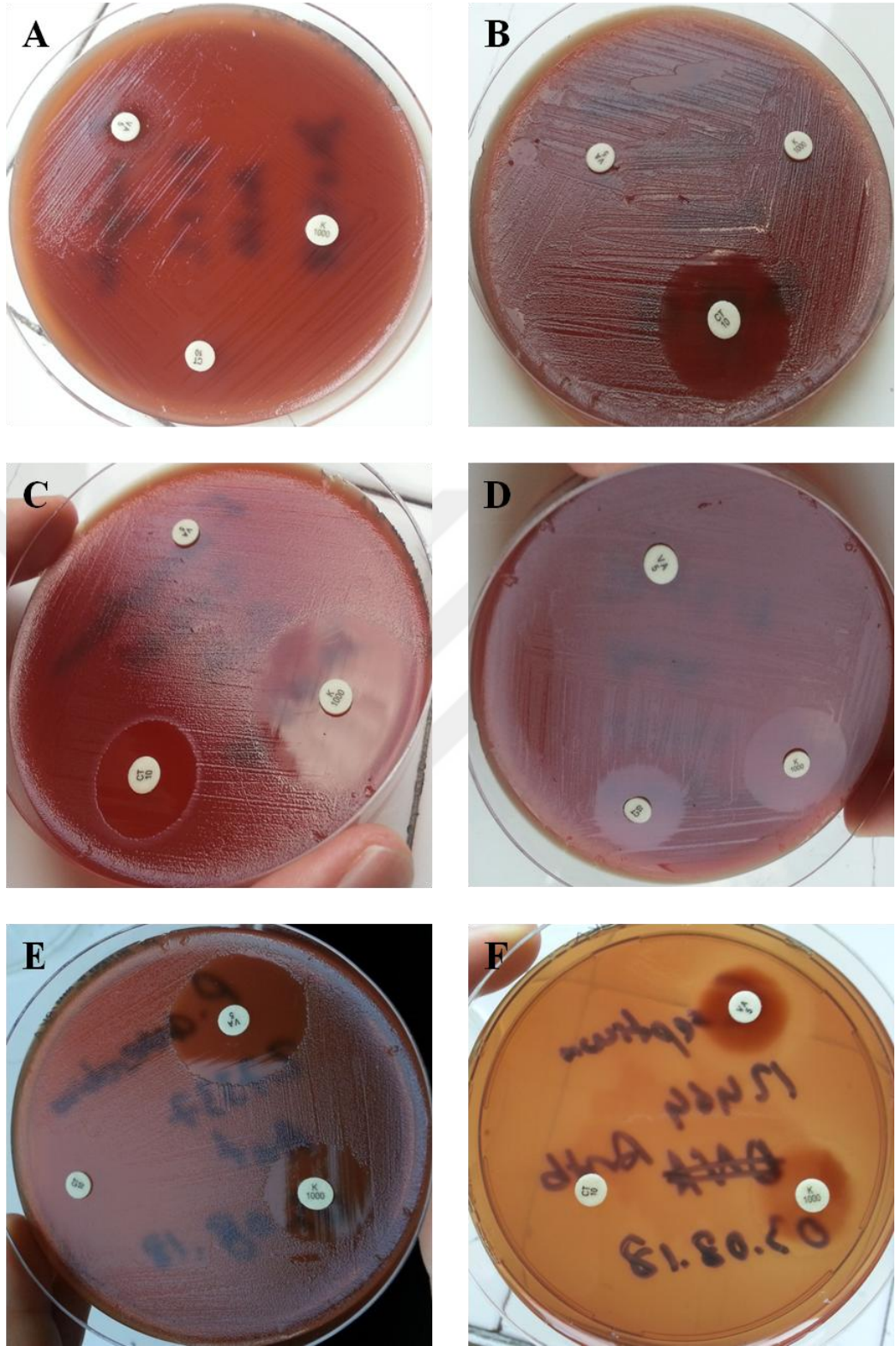
^a R, dirençli; S, duyarlı; V, kararsız-değişken. Duyarlılık zonu: ≥ 10 mm, Direnç zonu: ≤ 10 mm

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

^c *Alistipes*, *Odoribacter*, *Parabacteroides* cinsinden türler içerir.

^d *Tannerella*, *Sutterella*, *Leptotrichia* ve *Bilophila* cinsindeki türlerde de aynı model görülmektedir.

^e *Porphyromonas* türleri vankomisine duyarlıdır ancak pigmentlidir ve floresan verir.



Resim 2.9. Özel potensli antibiyotik disklerinin farklı bakterilerdeki görünümü (Orijinal).
 A, *B. vulgatus*; B, *P. intermedia*; C, *F. necrophorum*; D, *V. parvula*;
 E, *P. anaerobius*; F, *C. septicum*.

2.20.3. Spot İndol Testi

İndol testi, anaerobik bakterilerin gruplandırılmasında ve tanımlanmasında önemlidir. İndol, triptofan enzimini içeren bazı organizmalar tarafından triptofandan ayrılır. Triptofan içeren kanlı veya yumurta sarılı besiyerinde üreyen koloniler filtre kağıdına alınıp, p-dimetylaminocinnemaldehide (DMCA) damlatılarak indol oluşumu renk değişimi ile değerlendirilir (Hall ve Summanen, 2016).

2.20.4. Nitrat Redüksiyon Testi

Nitrat redüktaz enzimine sahip olan mikroorganizmalar nitrati nitrite indirgeyebilirler. Anaerob mikroorganizmaların tiplendirilmesinde ve gruplandırılmasında yararlıdır (Hall ve Summanen, 2016).

2.20.5. Katalaz Testi

Anaerob bakterilerde katalaz enziminin varlığını araştırmak için geleneksel %3'lük H₂O₂ yerine %15'lik H₂O₂ çözeltisi tercih edilir (Hall ve Summanen, 2016).

2.20.6. SPS (Sodyum Polianetol Sulfonat) Diski (1mg)

Gram pozitif anaerob kok izole edildiğinde SPS diskine duyarlı (≥ 12 mm) ise *Peptostreptococcus anaerobius* olarak tanımlanır. SPS dirençli (<12 mm) gram pozitif kok, spot indol pozitif ise *P. asaccarolyticus* olarak tanımlanabilir (Hall ve Summanen, 2016).

2.20.7. Safra Testi

B. fragilis grubu, *Fusobacterium mortiferum*, *Fusobacterium varium* ve *Bilophila wadsworthia* safra varlığında çoğalabilen klinik olarak önemli anaerobik Gram negatif basillerdir. Test BBE agar gibi safra içeren besiyerleri ile ya da %20 safra emdirilmiş disklerle yapılabilir (Hall ve Summanen, 2016).

2.20.8. Floresans Testi

Anaerob bakterilerin UV ışığında (366nm) floresans verme özellikleri Tablo 2.12'de gösterilmiştir (Hall ve Summanen, 2016).

Tablo 2.12. Anaerobik bakterilerin floresans verme özellikleri (Hall ve Summanen, 2016).

Mikroorganizmalar	Floresans Rengi
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	Kırmızı ^a
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	Kırmızı ^a
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Oluşturmaz
Pigmentli <i>Prevotella</i> spp.	Kırmızı ^a
Pigmentsiz Gram-negatif basil	Oluşturmaz veya pembe, turuncu, sarı
<i>Fusobacterium</i> spp.	Açık yeşil
<i>Veillonella</i> spp.	Kırmızı
<i>Eubacterium lentum</i>	Kırmızı
<i>Clostridium difficile</i>	Açık yeşil
<i>Clostridium innocuum</i>	Açık yeşil

^aSiyah pigment oluşturduğunda floresans verir.

2.20.9. Lesitinaz, Lipaz ve Proteolitik Enzim Reaksiyonları

Lesitinaz, lipaz ve proteolitik enzimlerinin aktivitelerini tanımlamak için yumurta sarılı agar (EYA) kullanılarak *Clostridium* türleri identifiye edilebilir. Lesitinaz, yumurta sarısında bulunan lesitini ayırır ve koloninin etrafında opak bir bölge oluşturan çözünmeyen yağ (digliserit) açığa çıkarır. Lipaz, trigliserid ve digliseridleri, yağ asidi ve gliserole hidrolize eder. Proteolitik enzim üreten mikroorganizmalar, kolonilerin etrafında genellikle oldukça dar ve berrak bir zon oluşturur (Fader, 2019).

2.20.10. Üreaz Testi

Mikroorganizmanın üreyi parçalama yeteneğini saptar. Ürenin üreaz enzimi ile hidrolizi sonucu amonyak serbestleşir ve oluşan alkali ortam indikatör fenol ile sarıdan kırmızıya döner (Hall ve Summanen, 2016).

2.21. Yarı ve Tam Otomatize Sistemlerle İdentifikasyon

Anaerob bakterilerin kesin tanımlarının yapılabilmesi için biyokimyasal özelliklerinin ve oluşturdukları bazı enzimlerin gösterilmesi gerekir. Bu özelliklerini gösterebilmek için laboratuvarında klasik yöntemlerle hazırlanan besiyerleri tür düzeyinde tanı için yetersiz olabilir. Bunu yerine çok sayıda biyokimyasal madde içeren minyatürize biyokimyasal yöntemler geliştirilmiştir. Anaerobların identifikasyonunda kullanılan otomatize sistemler Tablo 2.13'de gösterilmiştir (Hall ve Mangels, 2016d; 2016a).

Tablo 2.13. Otomatize ve yarı otomatize sistemler ve özellikleri

Test / Kit Adı	Üretici Firma	İnkübasyon süresi (Saat)	Biyokimyasal test sayısı
API 20A	bioMérieux	24	21
AN MicroPlate	Biolog	20-24	95
Rapid ID 32A	bioMérieux	4	29
RapID-ANA II	Remel	4	18
Crystal ANR ID	BD Biosciences	4	29
MicroScan Rapid Anaerobe panel	Beckman Coulter	4	24
Vitek 2 ANC	bioMérieux	6	64

2.22. Anaerob Bakterileri Tanımlamada Kullanılan Diğer Yöntemler

Bu yöntemler anaerob bakterilerin fenotipik özelliklerine dayanmamasına rağmen identifikasyon için anaerob kültüre ihtiyaç duyan yöntemlerdir.

2.22.1. MASS Spektrometri (MS) Sistemleri ile İdentifikasyon

Kütle spektrometresi (MS), proteinler, şekerler, lipidler veya DNA gibi büyük molekülleri analiz eder. Hızlı, tekrar üretilebilir ve doğru tanımlamalar sağlar. İki farklı MS teknolojisi kullanılmaktadır, bunlardan ilki uçuşun matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon süresi (MALDI-TOF) ve diğeri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile kombine elektrosprey iyonizasyonu (PCR / ESI) teknikleridir. Tüm MS uygulamaları analitin iki özgün özelliğinin, moleküler kütlenin ve yükün doğrudan ölçümüne dayanır.

1) MALDI - TOF MS Tekniği

Tüm bakteri hücrelerinden protein parmak izi imzaları üretmek için kullanılır. Bu yöntemin, geleneksel fenotipik testlerden daha doğru, hızlı ve tekrarlanabilir olduğu bulunmuştur (Nolte, 2015; Emery ve ark., 2016; Hall, 2016; Procop ve ark., 2017).

Mevcut MALDI-ToF MS Sistemleri;

- Microflex LT (Bruker Daltonics)
- Vitek MS (bioMérieux)
- Axima@Saramis (Shimadzu Biotech)

2) PCR - ESI MS Tekniği

Multiplex PCR ile ampliconlar üretilir ve daha sonra MS ile ampliconların kütle / yük oranı ölçülür. PCR, bir veritabanında bilinen dizilere kıyasla hem korunmuş hem de türlere özgü gen dizilerini hedefler (Nolte, 2015; Emery ve ark., 2016).

Mevcut PCR-ESI MS Sistemleri;

- PLEX-ID (Abbott)
- T5000 Universal Biosensor (Ibis)

2.22.2. Gaz Kromatografisi Yöntemi ile İdentifikasyon

Hücrel yağ asidi (CFA) metil esterlerinin analizi yoluyla bakterilerin analizine ve tanımlanmasına yarayan bir sistemdir. Hücrel yağ asitleri, bakteriyel kromozomlar üzerinde kodlanır ve basit mutasyonlardan veya plazmid kaybından etkilenmezler. Dolayısıyla, belirli bir organizmanın CFA bileşimi, organizma belirli büyüme koşulları altında büyütüldüğünde nispeten karardır. CFA profilleri manuel olarak tanımlanabilmesine rağmen, bilgisayarlı, yüksek çözünürlüklü gaz-sıvı kromatografisi (GLC) ve özel yazılım programları ile bilinmeyen mikroorganizmanın CFA profili, bilinen türlerin modelleriyle karşılaştırılarak sonuç verilir. Bu alandaki mevcut sistem MIDI Sherlock Microbial Identification sistemidir (Carroll ve Patel, 2015; Emery ve ark., 2016; Procop ve ark., 2017).

2.23. Anaerobların Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler

Fenotipik yöntemlerin yanı sıra bakterilerin tanımlanmasında moleküler yöntemler de kullanılmaktadır. Moleküler yöntemler, enfeksiyon hastalıkların patogenezinin ve epidemiyolojisinin araştırılmasına katkıda bulunmuştur. Fenotipik yöntemlere göre canlı mikroorganizmaya gereksinim duymaması, daha hızlı sonuç vermesi, yüksek duyarlılığa ve spesifikliğı sahip olması bu yöntemlerin tercih edilmesini sağlamaktadır (Aksu, 2011; Gönüllü, 2015; Emery ve ark., 2016).

Moleküler yöntemlerin büyük çoğunluğu PCR dayalı yöntemlerden oluşmaktadır. Anaerob bakterilerin tanısında ve tiplendirilmesinde kullanılan başlıca moleküler teknikler arasında; Broad-range PCR, konvansiyonel PCR, multiplex PCR, nested PCR, real-time PCR, rep-PCR, dijital PCR, parmak izi analiz yöntemleri (DGGE, TGGE,

T-RFLP), ribotyping, DNA hibridizasyonu, floresan in-situ hibridizasyon, DNA mikroarray, dizi analiz (sekans) yöntemleri gibi teknikler yer almaktadır.

Bunlar arasında mikroorganizma türlerinin tanımlanmasında en yaygın kullanılan yöntem, ribozomal RNA (rRNA) genlerinin ve sekans analizine dayanan yöntemdir. Bakterilerde rRNA operonu, 16S, 23S, ve 5S rRNA bölgelerini ve aralarında kalan ITS (intergenic spacer region)'leri içermektedir. rRNA gen dizilimi, bakteri türleri arasında yüksek oranda korunurken, aynı zamanda filogenetik sinyaller içeren farklı bölgeler de içermektedir. Bu özellikleriyle rRNA, bakterilerin filogenetik identifikasyonu için önemli bir gen bölgesidir. Yaklaşık 1,500 baz-çifti uzunluğundaki 16S rRNA geni, PCR primerleri için en uygun kombinasyonların oluşturulabileceği korunmuş bölgeler taşıdığından ve aynı zamanda bakterilerin tür ve alt-tür seviyesinde filogenetik ayırımına ve sınıflandırılmasına imkan verecek şekilde farklı genomlar arasındaki evrimsel uzaklığa orantılı olarak farklılık gösteren değişken bölgeler içerdiğinden filogenetik identifikasyon için diğer iki rRNA genine kıyasla daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca bakteri hücresi içerisinde binlerce kopya 16S rRNA bulunduğundan, bu gen bölgesini temel alan yöntemlerin duyarlılığının da yüksek olduğu bildirilmektedir (Aksu, 2011; Gürsoy ve Otlu, 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmalara başlamadan önce klinik olarak en sık karşılaşılan anaerob bakteriler ve bunların tanısında kullanılan moleküler biyolojik tanı yöntemleri, çalışmaya dahil edilen 7 farklı cinse ait spesifik primer DNA dizi tasarımları ve hedef aldıkları genler ile ilgili literatür taraması yapıldı. Tez proje önerisinin Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanması sonrasında Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne başvuru yapılarak deneyler için gerekli malzemelerin temini ve uygun alt yapı oluşturulması sağlandı. Çalışma için Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi (ERÜTF) Etik Kurulu'ndan 02.06.2017 tarih ve 2017/318 sayılı karar ile onay alındı.

Çalışma, ERÜTF Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı ve ERÜ Genom ve Kök Hücre Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan aşağıdaki cihaz (Tablo 3.1) ve malzemeler (Tablo 3.2) kullanılarak yürütüldü.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Sıra	Cihaz/Adı
1	ChemiDoc Mp Jel Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad, ABD)
2	Distile Su Cihazı (Elga, İngiltere)
3	Etüv (Nüve, Türkiye)
4	Güç Kaynağı (Bio-Rad, ABD)
5	Hassas Terazı (Radwag, Polonya)
6	Işık Mikroskobu (Olympus, Japonya)
7	Kuru Isı Blogu (Benchmark, ABD)
8	Manyetik Karıştırıcı (Nüve, Türkiye)
9	McFarland Densitometre (BD, ABD)
10	Mikro İnsineratör (Baygen, Türkiye)
11	Mikrodalga Fırın (Arçelik, Türkiye)
12	Mikrosantrifüj Cihazı (Thermo Scientific, ABD)
13	NanoDrop 2000c Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)
14	Otoklav (Nüve, Türkiye)
15	PCR Cihazı (Sensoquest, Almanya)
16	Santrifüj Cihazı (Nüve, Türkiye)
17	Sınıf II Biyogüvenlik Güvenlik Kabini (Nüve, Türkiye)
18	Vitek 2 DensiCHEK
19	Vitek 2 Otomatik Bakteri İdentifikasyon Cihazı (bioMérieux, Fransa)
20	Vorteks (Benchmark, ABD)
21	Yatay Elektroforez Cihazı (Bio-Rad, ABD)
22	-20 Derin Dondurucu (Siemens, Almanya)
23	-80 Derin Dondurucu (Panasonic, Japonya)
24	+4 Buzdolabı (Uğur, Türkiye)

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan malzemeler

Sıra Tanımı/Adı
1 <i>Actinomyces israelii</i> ATCC 12102 (DSM43320, Almanya)
2 <i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 12104 (CECT 806, İspanya)
3 <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 (Microbiologics, ABD)
4 <i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482 (Microbiologics, ABD)
5 <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124 (Microbiologics, ABD)
6 <i>Clostridium septicum</i> ATCC 12464 (Microbiologics, ABD)
7 <i>Fusobacterium necrophorum</i> ATCC 25286 (Microbiologics, ABD)
8 <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586 (Microbiologics, ABD)
9 <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337 (Microbiologics, ABD)
10 <i>Parvimonas micra</i> ATCC 33270 (Microbiologics, ABD)
11 <i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611 (DSM20706, Almanya)
12 <i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 (Microbiologics, ABD)
13 <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 (DSM20709, Almanya)
14 <i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790 (Microbiologics, ABD)
15 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 (Microbiologics, ABD)
16 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (Microbiologics, ABD)
17 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (Microbiologics, ABD)
18 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 (Microbiologics, ABD)
19 Agarose (Carl Roth, Almanya)
20 Anaerob ortam sağlayıcı (Mitsubishi Gas Chemical (MGC), Japonya)
21 Anaerob taşıma besiyeri (Hardy Diagnostics, ABD)
22 Anaerobik 2,5L rectangular jar (MGC, Japonya)
23 Api 20A Bakteri identifikasyon kiti (bioMérieux, Fransa)
24 Boncuklu bakteri saklama tüpleri (Orbak, Türkiye)
25 Borik asit (Sigma-Aldrich, ABD)
26 Çikolata agar hazır besiyeri (Liofilchem, İtalya)
27 DNA gel loading dye 6X (5x1 ml) (TransGen Biotech, Çin)
28 DNA Marker/ Step Ladder 100 bp (500 µl) (TransGen Biotech, Çin)
29 DNA Marker/ Step Ladder 50 bp (500 µl) (Genedirex, Tayvan)
30 DNTP mix 10 mM (200µl) (Hibrogen, Türkiye)
31 EDTA for electrophoresis (Sigma-Aldrich, ABD)
32 Ethidium bromide solution (10 ml) (Merck, Almanya)
33 Hazır Gram boyama seti (4x500 ml/Set) (Liofilchem, İtalya)
34 Hot Start Taq DNA Polimeraz 500 units (5 U/µL) (abm, Kanada)
35 Kanamisin 1000 µg antibiyotik diski (Bioanalyse, Türkiye)
36 Kolistin 10 µg antibiyotik diski (Bioanalyse, Türkiye)
37 Lizozim enzimi (Bioshop, Kanada)
38 PCR Master Mix (Bio-helix, Tayvan)
39 PCR tüpü (M.plastic, Çin)
40 Primerler (HPLC saflığında, 100 pmol) (NYZ, Portekiz)

- 41 RNaz A çözeltisi (Promega, ABD)
- 42 Schaedler Broth (Liofilchem, İtalya)
- 43 Steril eküvyon çubuğu (LP Italiana, İtalya)
- 44 Steril filtreli pipet ucu, 0,1-10 µl (M.plastic, Çin)
- 45 Steril filtreli pipet ucu, 100-1000 µl (M.plastic, Çin)
- 46 Steril filtreli pipet ucu, 10-100 µl (M.plastic, Çin)
- 47 Steril plastik petri kutusu (90 mm çaplı) (Fıratmed, Türkiye)
- 48 Steril sarı kapaklı tüp 10 ml (LP Italiana, İtalya)
- 49 Total DNA ekstraksiyon kiti (GeneAll Biotechnology, G. Kore)
- 50 Tris base (for electrophoresis) (Sigma-Aldrich, ABD)
- 51 Vankomisin 5 µg antibiyotik diski (Bioanalyse, Türkiye)
- 52 %5 Koyun kanlı agar hazır besiyeri (Orbak, Türkiye)
- 53 %5 Koyun kanlı Neomisin-Vankomisin Schaedler agar hazır besiyeri (bioMérieux, Fransa)
- 54 %5 Koyun kanlı Schaedler agar hazır besiyeri (Liofilchem, İtalya)

Çalışmada pozitif ve negatif kontrol DNA'ların elde edildiği organizmalar Tablo 3.3'de gösterildi. Pozitif kontrol için gerekli olan standart bakteri suşları ve diğer gereçler proje kapsamında satın alındı. Negatif kontrol için gerekli olan standart bakteri suşları Erciyes Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. Bakteriyoloji laboratuvarından temin edildi.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrol DNA'ları.

Pozitif Kontrol Suşları	Negatif Kontrol Suşları
<i>Actinomyces israelii</i> ATCC 12102	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 12104	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	<i>Parvimonas micra</i> ATCC 33270
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
<i>Clostridium septicum</i> ATCC 12464	<i>Homo sapiens</i>
<i>Fusobacterium necrophorum</i> ATCC 25286	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611	
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845	
<i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744	
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790	

3.1. Standart Bakteri Suşlarının Canlandırılması

Çalışmada kullanılacak olan standart bakteri suşları farklı kültür koleksiyonlarından temin edildi. Anaerob kültür için kullanılan katı besiyeri hazır olarak temin edildi, sıvı besiyeri ise laboratuvarında hazırlandı. Firmaların belirttiği yöntem uygun olarak suşların canlandırılması Sınıf II biyogüvenlik kabini içerisinde yapıldı.

3.1.1. Schaedler Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Schaedler Broth toz besiyerinden (Liofilchem, İtalya) 25,4g tartıldı ve 1000 ml'ye tamamlanacak şekilde distile su ile süspanse edildi. Besiyeri süspansiyonu manyetik karıştırıcı ile homojen hale geldikten sonra 10 ml'lik vida kapaklı cam tüplere 5'er ml dağıtıldı. Daha sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Hemen kullanılmayan sıvı besiyeri tüpleri +4°C'de saklandı.

3.1.2. Eküvyon Tarzında Sunulan Liyofilize Standart Suşları Canlandırma Yöntemi

1. Açılmamış KWIK-STIK torbası oda sıcaklığına gelinceye kadar beklenildi. Torba çentiğinden yırtıldı ve KWIK-STIK ünitesi çıkarıldı.
2. KWIK-STIK ambalajının üzerindeki etiket kaldırılarak ekim yapılacak kültür plakasının üzerine yapıştırıldı. KWIK-STIK ünitesinin rehidrasyon sırasında ayrılmamasına özen gösterildi.
3. KWIK-STIK ünitesinin üst kısmına bastırılarak ampul kırıldı ve içinde bulunan nemlendirici sıvı serbest bırakıldı.
4. Sıvı akışını kolaylaştırmak için KWIK-STIK ünitesi dik olarak tutuldu ve pelletin bulunduğu üniteye sıvının ulaşması için alt kısmı sert bir yüzeye vuruldu.
5. Pellet süspansiyonu homojen olana kadar KWIK-STIK ünitenin alt kısmı el ile ezildi.
6. KWIK-STIK ünitenin içinde bulunan eküvyon çubuğu aşağı itilerek homojen hale gelen pellet süspansiyonu içine batırıldı. Eküvyon çubuğu %5 koyun kanlı Schaedler agar (Liofilchem, İtalya) besiyerinin üçte biri üzerine sürüldü ve tek koloni ekimi yapıldı. Pellet süspansiyonunun bir kısmı aynı eküvyon çubuğu kullanılarak Schaedler sıvı besiyeri (Liofilchem, İtalya) içine aktarıldı.

7. Ekim yapılan katı besiyeri ters çevrilerek, sıvı besiyeri tüpleri ise kapakları gevşetilerek dik duracak şekilde dikdörtgen şekilli anaerobik jar (MGC, Japonya) içerisine anaerob ortam sağlayıcıyla birlikte (MGC, Japonya) yerleştirildi ve jarın kapağı kapatıldı. Besiyerleri anaerobik ortamda 37°C'de en az 48 saat inkübe edildi.
8. İşlem sonunda arta kalan malzemeler biyolojik tehlike imha yöntemlerine göre çöpe atıldı.

3.1.3. Cam Ampul İçinde Sunulan Liyofilize Standart Suşları Canlandırma Yöntemi

1. Ampulün ucu 10-15 saniye boyunca bek alevinde ısıtıldı.
2. Ampülü çatlatmak için ucuna iki veya üç damla steril su damlatıldı.
3. Ampulün ucu steril penset ile dikkatlice kırıldı.
4. İzolasyon malzemesi olan pamuklu tıpa, penset ile ampul içerisinden alındı ve içinde pellet olan cam tüp dışarı çıkartıldı.
5. Cam tüpün ağzında bulunan pamuk tıplar steril penset kullanılarak çıkartıldı.
6. Cam tüpün ağız kısmı bek alevinden geçirildi.
7. Cam tüpün içine 1 ml distile su eklenildi ve cam tüpün ağzı steril bir pamuk tıpa ile kapatılarak pelletin oda sıcaklığında anaerobik ortamda 30 dakika boyunca rehidrate olması sağlandı.
8. Süspansiyonun yarısı (0,5 ml), %5 koyun kanlı Schaedler agar (Liofilchem, İtalya) besiyerine aktarıldı ve tek koloni ekimi yapıldı. Süspansiyonun kalan kısmı ise Schaedler sıvı besiyeri (Liofilchem, İtalya) içine aktarıldı.
9. Ekim yapılan katı besiyeri ters çevrilerek, sıvı besiyeri tüpleri ise kapakları gevşetilerek dik duracak şekilde dikdörtgen şekilli anaerobik jar (MGC, Japonya) içerisine anaerob ortam sağlayıcıyla birlikte (MGC, Japonya) yerleştirildi ve jarın kapağı kapatıldı. Besiyerleri anaerobik ortamda 37°C'de en az 48 saat inkübe edildi.
10. Ekim sonunda arta kalan malzemeler biyolojik tehlike imha yöntemlerine göre çöpe atıldı.

3.2. Standart Bakteri Suşlarının Stoklanması ve Stoktan Canlandırılması

Primer kültür plaklarında üreyen bakteri kolonileri öze ile toplanarak içinde kriyoprotektan içeren boncuklu saklama besiyerlerine (mikrobank) (Orbak, Türkiye) pasajlandı. Mikrobank tüpleri, üzerine suş bilgileri yazıldıktan sonra vakit kaybetmeden -80°C 'ye ayarlı derin dondurucuya kaldırıldı.

Mikrobank içinde saklanan suşlar gerekli olduğu durumlarda yeniden canlandırmak için derin dondurucudan dışarı çıkartıldı. Ekim yapılacak olan katı besiyeri üzerine suş bilgileri ve tarih yazıldı. Mikrobank içindeki sıvı besiyeri hafif erdikten sonra steril bir iğne ile mikrobank içinden bir boncuk alınarak katı besiyeri üzerine konuldu. Boncuk, besiyeri üzerinde biraz gezdirildikten sonra petrinin kapağı kapatılıp ters çevrilerek anaerobik jar (MGC, Japonya) içerisine anaerob ortam sağlayıcıyla birlikte (MGC, Japonya) yerleştirildi ve jarın kapağı kapatıldı. Besiyerleri anaerobik ortamda 37°C 'de en az 48 saat inkübe edildi. Aerobik ve fakültatif bakteriler %5 koyun kanlı agara (Orbak, Türkiye), anaerobik bakteriler ise %5 koyun kanlı Schaedler agara (Liofichem, İtalya) ekildi. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra mikrobank vakit kaybetmeden derin dondurucuya kaldırıldı. Bütün işlemler Sınıf II biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi.

3.3. Bakteri Kültürlerinden ve Hasta Örneklerinden Total Genomik DNA İzolasyonu

Bakteri kültürlerinden ve hasta örneklerinden total genomik DNA izolasyonu için GeneAll Exgene Clinic SV mini Kit (GeneAll Biotechnology, G. Kore) kullanıldı. Kit'in uygulama prosedüründe yer alan işlem basamakları modifiye edilerek aşağıdaki protokoller uygulandı.

3.3.1. Gram Negatif Bakterilerden Total Genomik DNA İzolasyonu Protokolü

1. Uygun katı besiyerlerine bakterilerin yaygın ekimleri yapılarak anaeroblar için 2 gün aerob ve fakültatif bakteriler için 1 gün 37°C 'de uygun şartlarda inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerindeki koloniler öze ya da steril eküvyon çubuğu ile toplanarak 1 ml steril serum fizyolojik (SF) solüsyonu içinde süspanse edildi.

3. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içindeki bakteri süspansiyonu tam hızda ($\sim 13.000 \times g$) 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant atık kutusuna döküldü.
4. Pellet üzerine 200 μ l Buffer CL eklenerek hücre pelleti yeniden süspanse edildi.
5. Süspansiyon üzerine 20 μ l Proteinaz-K çözeltisi (20 mg/ml) eklenerek 15 sn vortekslendi ve 56°C 'ye ayarlanan ısı bloğunda 60 dakika inkübe edildi.
6. Tüpe 20 μ l RNaz çözeltisi (20 mg/ml) eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
7. Tüpe 200 μ l Buffer BL eklenerek 15 sn vortekslendi ve tüp ısı bloğuna yerleştirilerek 70°C 'de 10 dakika inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonunda tüp oda ısısına düşünceye kadar beklenildi. Daha sonra tüpe 200 μ l saf (%100) etanol ilave edilerek 15 sn vortekslendi.
9. Tüpün içindeki bütün karışım kit içerisinde bulunan SV kolonuna dikkatli bir şekilde aktarılarak SV kolonu $6,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi ve alt süzüntü atılarak SV kolonu yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
10. SV kolonuna 600 μ l Buffer BW eklenerek $6,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.
11. SV kolonuna 700 μ l Buffer TW eklenerek $6,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Süzüntü atıldıktan sonra SV kolonu toplama tüpüne geri yerleştirildi.
12. Yıkama tamponunu uzaklaştırmak için SV kolonu boş olarak tam hızda ($>13,000 \times g$) 1 dakika santrifüj edildi.
13. SV kolonu yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve üzerine 100 μ l tampon AE eklenildi.
14. SV kolonu oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra tam hızda ($>13,000 \times g$) 1 dakika santrifüj edildi.
15. İşlem sonunda SV kolonu atık kabına atıldı. Tüp içerisindeki son süzüntüden 1 μ l alınarak nanodrop spektrofotometre cihazında (Thermo Scientific, ABD) DNA miktarı ve saflık derecesi ölçülerek not edildi.
16. Total genomik DNA izolatları PCR basamağına kadar -80°C 'de muhafaza edildi.

3.3.2. Gram Pozitif Bakterilerden Total Genomik DNA İzolasyonu Protokolü

1. Uygun katı besiyerlerine bakterilerin yaygın ekimleri yapılarak anaeroblar için 2 gün aerob ve fakültatif bakteriler için 1 gün 37°C'de uygun şartlarda inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerideki koloniler öze ya da steril eküvyon çubuğu ile toplanarak 1 ml steril SF solüsyonu içinde süspanse edildi.
3. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içindeki bakteri süspansiyonu tam hızda (~13.000xg) 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant atık kutusuna döküldü.
4. Pellet üzerine 180 µl Lizozim (Bioshop, Kanada) enzimi (30 mg/ml) eklenerek hücre pelleti iyice süspanse edildi ve etüvde 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
5. Tüpe 20 µl RNaz A (Promega, ABD) çözeltisi (20 mg/ml) eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
6. Süspansiyon üzerine 20 µl Proteinaz-K çözeltisi (20 mg/ml) ve 200 µl Tampon BL eklenerek 15sn vortekslendi.
7. Tüp ısı bloğuna yerleştirilerek önce 56°C'de 120 dakika daha sonra 70°C'de 30 dakika daha inkübe edildi.
8. Bundan sonraki işlemlere Gram negatif bakteri DNA izolasyonunun 8. basamağı ile devam edildi.

3.3.3. Kan ve Vücut Sıvısından Total Genomik DNA İzolasyonu Protokolü

1. 1.5 ml'lik bir tüpün dibine 20 µl Proteinaz-K çözeltisi (20 mg/ml) pipetlendi ve üzerine 200 µl hasta örneği eklenerek iyice pipetaj yapıldı.
2. Tüpe 20 µl RNaz A (Promega, ABD) çözeltisi (20 mg/ml) eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
3. Tüpe 200 µl Buffer BL eklenerek vortekslendi. Tüp daha sonra ısı bloğuna yerleştirilerek 56°C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. Bundan sonraki işlemlere Gram negatif bakteri DNA izolasyonunun 8. basamağı ile devam edildi.

3.3.4. Doku ve Apseden Total Genomik DNA İzolasyonu Protokolü

1. 1.5 ml'lik tüpe 20 mg doku ya da apse konuldu ve üzerine 200 µl Tampon CL ekleyerek homojenize edildi.
2. Tüpe 20 µl Proteinaz-K çözeltisi (20 mg/ml) eklenerek 15 sn vortekslendi. Tüp daha sonra ısı bloğuna yerleştirilerek 56°C'de 120 dakika inkübe edildi.
3. Tüpe 20 µl RNaz A (Promega, ABD) çözeltisi (20 mg/ml) eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
4. Tüpe 200 µl Buffer BL eklenerek 15 sn vortekslendi ve tüp daha sonra ısı bloğunda 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.
5. Bundan sonraki işlemlere Gram negatif bakteri DNA izolasyonunun 8. basamağı ile devam edildi.

3.3.5. Eküvyonlu Taşıma Besiyeri ile Gelen Örneklerden Total Genomik DNA İzolasyonu Protokolü

1. Eküvyon çubuğu 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Pamuklu uç tüp içinde kalacak şekilde eküvyonun sapı steril bisturi ile kesildi ve tüpe 400 µl 1x phosphate buffered saline (PBS) solüsyonu eklendi.
2. Tüpe 20 µl RNaz A (Promega, ABD) çözeltisi (20 mg/ml) eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
3. Tüpe 20 µl Proteinaz-K (20 mg/ml) ve 400 µl Tampon BL eklenerek 15 sn vortekslendi ve tüp daha sonra ısı bloğuna yerleştirilerek 56°C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda tüp oda ısısına düşünceye kadar beklenildi. Daha sonra tüpe 400 µl saf (%100) etanol ilave edilerek 15sn vortekslendi.
5. Karışımın 700 µl'si kit içerisinde bulunan SV kolonuna dikkatli bir şekilde aktarılarak SV kolonu 6,000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi ve alt süzüntü atılarak SV kolonu toplama tüpüne geri yerleştirildi.
6. Kalan tüm karışımlar SV kolonuna uygulanana kadar 5. adımı tekrarlandı. Bütün karışım SV kolonundan süzöldükten sonra toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.

7. Bundan sonraki işlemlere Gram negatif bakteri DNA izolasyonunun 10. basamağı ile devam edildi.

3.4. Primer DNA Dizilerinin Tasarımı

Çalışmaya dahil edilen *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp., *Actinomyces* spp. ve *Peptostreptococcus* spp. cinslerine özgü 16S rRNA genini hedef alan primer DNA dizileri bu çalışmaya özgü olarak tasarlandı. 16S rRNA genini hedef alan *Veillonella* cinsine özgü primer DNA dizileri Matsuki (2007) tarafından yapılan çalışmadan, *Clostridium* cinsine özgü primer DNA dizileri ise Rinttilä ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmadan alındı. Çalışmada kullanılan primer DNA dizileri ve genel özellikleri Tablo 3.4'de belirtildi.

Primer DNA dizilerinin tasarımı ve analizi için NCBI Primer-BLAST veri tabanı kullanıldı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, Erişim tarihi: 10.07.2018).

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan primer DNA dizleri ve ampikon büyüklükleri.

Bakteri Cinsi	Primer	TM (°C)	Primer dizisi (5'→3')	Ampikon büyüklüğü (bp)	Referans
<i>Fusobacterium</i> spp.	Fuso 112F	54,97	CCAGCTTACTGGACAGATAC	528 bp	Bu çalışmaya özgü
	Fuso 112R	55,5	CGACTCTCTGTACTACCCAT		
<i>Veillonella</i> spp.	g-Veillo68-F	54,71	GAAGAGCGATGGAAGCTT	459 bp	Matsuki (2007)
	g-Veillo490-R	52	CCGTGGCTTTCTATTCC		
<i>Actinomyces</i> spp.	Act 449F	55,52	GTGAGTAACACGTGAGCAA	401 bp	Bu çalışmaya özgü
	Act 449R	56,15	CTTCTTACCCAGCTACCGT		
<i>Bacteroides</i> spp.	Bact 247F	55,19	GATGAATACTCGCTGTTTGC	362 bp	Bu çalışmaya özgü
	Bact 247R	55,31	CCTTCCTCACATCTTACGAC		
<i>Prevotella</i> spp.	Prevo 107F	56,89	CACAGTAAACGATGGATGCC	291 bp	Bu çalışmaya özgü
	Prevo 107R	56,89	GTTATGGCACTTAAGCCGAC		
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	Pepto 907F	54,92	AAGGTCTTCGGATCGTAAAG	173 bp	Bu çalışmaya özgü
	Pepto 907R	55,6	CCTTTAACCACCGACTTGAA		
<i>Clostridium</i> spp.*	Clost F	56,99	ATGCAAGTCGAGCGAGG	120 bp	Rinttilä ve ark. (2004)
	Clost R	54,74	TATGCGGTATTAATCTCCCTT		

**Clostridioides difficile* (eski adıyla *Clostridium difficile*) dışındaki histotoksik *Clostridium*'lar

3.5. Primer DNA Dizilerinin Özgüllüklerinin Belirlenmesi

NCBI Primer-BLAST veri tabanı kullanılarak primer DNA dizilerinin özgüllükleri teorik olarak belirlendi. Cinse özgü tasarlanan her primer çiftinin özgüllükleri, öncelikle o cins içerisindeki farklı türlerin, çalışmaya dahil edilen diğer bakteri cinslerinin ve türlerinin, sonrasında bakteri filumlarının (Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Actinobacteria, Enterobacteriaceae, Proteobacteria) ve en son olarak da Bakteria domaini ve insan (*Homo sapiens*) genomik DNA sekans verileri üzerinde çapraz BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yapılarak belirlendi. Araştırılan cins için spesifikliğı yüksek olan primer dizileri çalışmaya dahil edildi.

Cinse özgü tasarlanan primer DNA çiftlerinin gerçek çalışma ortamındaki özgüllükleri ise hem özgül oldukları bakteri cinsinden hem de çalışmaya dahil edilen diğer bakteri cinslerinden ve insan kanından elde edilen total genomik DNA'lar üzerinde PCR çalışması yapılarak belirlendi.

3.6. Multiplex PCR Reaksiyon Karışımı

Pozitif kontrol ve hasta örnekleri için multiplex PCR reaksiyon karışımı Tablo 3.5 ve 3.6'da belirtildiğı şekilde optimize edildi. Primer DNA dizilerinin konsantrasyonu 20 pmol olarak ayarlandı.

Tablo 3.5. Pozitif kontrol için multiplex PCR reaksiyon karışımı.

Bileşen	Her örnek için hacim (µl)
PCR Master miks	12,5 µl
Primer karışımı	
Fuso 112F	0,25 µl
Fuso 112R	0,25 µl
Prevo 107F	0,25 µl
Prevo 107R	0,25 µl
Bact 247F	0,25 µl
Bact 247R	0,25 µl
g-Veillo-F	0,25 µl
g-Veillo-R	0,25 µl
Clost F	0,25 µl
Clost R	0,25 µl
Act 449F	1 µl
Act 449R	1 µl
Pepto 907F	0,25 µl
Pepto 907R	0,25 µl
DNA karışımı	
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	0,5 µl
<i>Veillonella atypica</i>	0,7 µl
<i>Actinomyces naeslundii</i>	2 µl
<i>Bacteroides fragilis</i>	0,5 µl
<i>Prevotella intermedia</i>	0,5 µl
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0,5 µl
<i>Clostridium septicum</i>	0,5 µl
Distile su	2,3 µl
Toplam Hacim	25 µl

Tablo 3.6. Her hasta örneği için multiplex PCR reaksiyon karışımı.

Bileşen	Her örnek için hacim (µl)
PCR Master miks	12,5 µl
Primer karışımı	
Fuso 112F	0,5 µl
Fuso 112R	0,5 µl
Prevo 107F	0,5 µl
Prevo 107R	0,5 µl
Bact 247F	0,5 µl
Bact 247R	0,5 µl
g-Veillo-F	0,5 µl
g-Veillo-R	0,5 µl
Clost F	0,5 µl
Clost R	0,5 µl
Act 449F	0,5 µl
Act 449R	0,5 µl
Pepto 907F	0,5 µl
Pepto 907R	0,5 µl
Örnek DNA	4 µl
Distile su	1,5 µl
Toplam Hacim	25 µl

3.7. Multiplex PCR Thermal Cycler Cihazı Çalışma Protokolü

Çalışmada Labcycler 48 Gradient (Sensoquest, Almanya) PCR cihazı kullanıldı. Multiplex PCR çalışma protokolü Tablo 3.7'de belirtildiği şekilde optimize edildi.

Tablo 3.7. Thermal cycler cihazı multiplex PCR çalışma protokolü

Sıcaklık	Süre	Döngü
95 °C	10 dakika	1 döngü
94 °C	30 saniye	35 döngü
55 °C	40 saniye	
72 °C	45 saniye	
72 °C	7 dakika	1 döngü
4 °C	∞	

3.8. Multiplex PCR'in Analitik Duyarlılığının Belirlenmesi

Multiplex PCR testinin analitik duyarlılığını belirlemek için standart suşların 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer bakteri süspansiyonları hazırlandı. Birçok bakteri türü için 0,5 McFarland standardına ayarlanmış kültürler yaklaşık $1-2 \times 10^8$ CFU/ml içerir. Bu süspansiyonların 1 ml'sinden DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA izolatlarının yoğunluğu nanodrop spektrofotometre cihazında (Thermo Scientific, ABD) ng/μl cinsinden ölçüldü. Ölçüm sonuçlarına göre 0,5 McFarland bakteri yoğunluğundan elde edilen DNA miktarı hesaplandı.

DNA miktarı belirlendikten sonra DNA izolatlarının 1/10 oranında seri dilüsyonları yapıldı. Bu sayede her cins bakteri için 10^6 - 10^1 bakteriye denk gelen seri DNA izolatları elde edildi. Her bir seri dilüsyon tüpünden 1 μl alınarak optimize edilen multiplex PCR test paneli ile ayrı ayrı çalışıldı. PCR ürünleri agaroz jel üzerindeki kuyucuklara sırasıyla pipetlendi. Agaroz jel üzerinde en son görülen PCR bandı tespit edilerek not edildi. Bu sayede multiplex PCR testinin analitik duyarlılığı her bir cins bakteri için belirlendi.

3.9. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemiyle PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

3.9.1. Elektroforez Tampon Solüsyonunun Hazırlanması

Tris-Borik asit-EDTA (TBE) elektroforez tamponunun (5X stok solüsyonu) hazırlanması;

- Trizma-base (Sigma, ABD) 54 g
- Borik asit (Sigma, ABD) 27,5 g
- EDTA (Sigma, ABD) 3,72 g

Tartılan kimyasallar üzerine deiyonize su (dH₂O) eklenilerek 1 litreye tamamlandı ve manyetik karıştırıcı ile homojen hale getirildi. Karışımın pH değeri 8'e ayarlandı. Çalışmalarda 0,5X TBE solüsyonu kullanıldı. 100 ml 5X TBE stok solüsyonu üzerine 900 ml dH₂O eklenerek 0,5X TBE solüsyonu elde edildi.

3.9.2. Agaroz Jelin Hazırlanması

Birbirine yakın olan PCR bandlarını ayırmak için çalışmada %2,5'luk agaroz jel kullanıldı. Agaroz jelin hazırlanması şu şekilde yapıldı;

1. 2,5g agaroz (Carl Roth, Almanya) tartıldı.
2. Tartılan agaroz üzerine 100 ml 0,5X TBE döküldü ve iyice karıştırıldı.
3. Bu karışım mikrodalga fırında maksimum derecede çözüldü.
4. Agaroz tamamen eridikten sonra elle tutulur sıcaklığa gelinceye kadar soğutuldu.
5. Sonra agaroz solüsyonunun üzerine 6 µl etidyum bromid (Merck, Almanya) konuldu ve iyice karıştırıldı.
6. Tarak jel tepsisine yerleştirildikten sonra, agaroz solüsyonu etrafı kapatılmış jel tepsisine döküldü ve jelin katılaşması için 15-20 dakika beklenildi.
7. Pozitif kontrol bandlarının birbirinden iyice ayrılabilmesi için pozitif kontrol DNA'larının pipetlendiği kuyucuk genişletildi. Bunun için jel üzerine konan taramanın iki dişi selobant ile yapıştırıldı.
8. Agaroz jel tamamen katılaştıktan sonra tepsisi ile beraber elektroforez tankına yerleştirildi. Agaroz jel içinde kalacak şekilde tankının içi 0,5X TBE solüsyonu ile dolduruldu. Sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı.

3.9.3. PCR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi

1. Her PCR ürününün 20 µl'si birbirini izleyen kuyucukların içine yavaşça pipetlendi.
2. Geniş kuyucuğa pozitif kontrol PCR ürünü pipetlendi.
3. İlk ve son kuyucuğa 50bp'lik DNA marker (Genedirex, Tayvan) yavaşça pipetlendi.

3.9.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

1. DNA'nın anoda doğru hareket edeceği biçimde elektroforez tankının kapağı kapatıldı.

2. Güç kaynağının voltajı 100 V'a ayarlandıktan sonra PCR ürünleri jelin içinde uygun uzaklığa hareket edene kadar 65 dakika yürütüldü.
3. Daha sonra ChemiDoc Mp görüntüleme cihazında (BioRad, Almanya) UV ışığı altında jel görüntülendi ve pozitif kontrollere göre PCR bandlarının yerleri belirlenerek not edildi.

3.10. Hasta Örneklerinin Geleneksel Mikrobiyolojik Yöntemlerle İşleme Alınması

3.10.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Anaerobik bakterileri tanımlamaya yönelik geliştirilen multiplex PCR panelinin hasta örnekleri üzerinde çalışılması için ERÜTF Hastanesi'nde çeşitli klinik birimlerden 02 Ağustos 2018 ile 06 Şubat 2019 tarihleri arasında anaerob kültür istemiyle Tıbbi Mikrobiyoloji A. D. Bakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen 46 rutin klinik örnek işleme alındı. Örneklerin anaerob ortamda laboratuvara taşınması için bazı kliniklere anaerob taşıma besiyeri (Hardy Diagnostics, ABD) dağıtıldı. Geleneksel mikrobiyolojik tanımlama işleminden sonra örneklerin artakalan kısmı multiplex PCR yöntemi ile çalışılmak üzere -20°C de saklandı.

3.10.2. Örneklerin Ön İnceleme İşlemleri

Bakteriyoloji laboratuvarına anaerob kültür için gönderilen tüm hasta örnekleri, anaerob kültür için uygun örnek olup olmadıklarına bakılmaksızın işleme alındı. İşleme alınan hasta örnekleri makroskobik özellikleri (örneğin görünümü, rengi, kokusu, gaz içerip, içermemesi, sarı renkte sülfür granüllerinin varlığı gibi) incelendikten sonra Gram boyama yapılarak mikroskobik özellikleri incelendi. Gram boyama yöntemiyle anaerob bakterilerin tipik morfolojik özellikleri ve spor yapıları incelendi. Ön inceleme işleminden sonra örnekler kültür işlemine alındı.

3.10.3. Kültür

İşleme alınan bütün örneklerin aerob ve anaerob kültürleri yapıldı. Aerob kültür için örnekler %5 koyun kanlı agara (Orbak, Türkiye) ekilerek 35-37°C'de 48 saat inkübe edildi. Anaerob kültür için örnekler %5 koyun kanlı Schaedler agar (Liofilchem, İtalya) ve %5 koyun kanlı Neomisinli-Vankomisinli Schaedler agar (bioMérieux, Fransa) besiyerlerine ekilerek anaerobik jar (MGC, Japonya) içerisine anaerob ortam sağlayıcıyla birlikte (MGC, Japonya) yerleştirildi ve jarın kapağı kapatıldı. Besiyerleri

anaerobik ortamda 35-37°C'de en az 48 saat, en çok bir hafta inkübe edildi. Bu sürenin sonunda anaerob kültür plakları ile aerob kültür plakları karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Anaerob kanlı agarda üreyen her farklı koloni incelenerek morfolojik özellikleri (agari çukurlaştırma, ekmek kırıntısı görünümü, sahanda yumurta görünümü, agarda yeşilimsi renk oluşumu, esmer pigment oluşturma vb.) ayrıntılı bir şekilde not edildi. Daha sonra bu kolonilere aerotolerans testi yapıldı. Aerotolerans testi için pasajları yapılan kolonilerin Gram boyaması yapılarak mikroskopik özellikleri incelendi.

3.10.4. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması

Aerotolerans testi sonucunda zorunlu anaerob olduğu kesinleşen bakteri kolonileri identifikasyon işlemine alındı. Anaerob bakterilerin identifikasyon işlemi için Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) otomatize tanımlama ve Api 20 A (bioMérieux, Fransa) yarı otomatize tanımlama sistemleri kullanıldı.

a. Vitek 2 cihazı ile identifikasyon

Anaerob kanlı agarda üreyen saf koloniler steril eküvyon çubuğu ile alınarak kit ile birlikte verilen özel solüsyona inoküle edildi. Vitek 2 DensiCHEK (bioMérieux, Fransa) cihazı kullanılarak 3 McFarland bulanıklığına eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlandı. Vitek 2 ANC ID kartı ve bakteri süspansiyonu cihaza yerleştirildi. Süspansiyonların kartlara dolumu, okuma, değerlendirme ve raporlama Vitek 2 cihazı tarafından otomatik olarak yapıldı.

b. Api 20 A kiti ile identifikasyon

Anaerob kanlı agarda üreyen saf koloniler steril eküvyon çubuğu ile alınarak kit ile birlikte verilen özel besiyerine inoküle edildi. Vitek 2 DensiCHEK (bioMérieux, Fransa) cihazı kullanılarak 3 McFarland bulanıklığına eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlandı. Nemli ortam oluşturmak için inkübasyon kapaklarının içi 5 ml distile su ile dolduruldu. API 20 A stribinin üzerindeki kuyucuklar steril bir pipet kullanılarak bakteri süspansiyonu ile dolduruldu. GEL testi için hem kuyucuk hem de küpül kısmı süspansiyonla doldurulurken, IND testi için kuyucuk süspansiyonla, küpül kısmı ise buharlaşma sonucunda indol oluşumunu önlemek için mineral yağ ile dolduruldu. Diğer testlerin kuyucukları süspansiyon ile doldurulup küpül kısmı boş bırakıldı. İnkübasyon kutusunun kapağı kapatılarak 37°C'de 24 saat anaerobik kavanozda inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında kuyucuklara ayıraçlar damlatılarak biyokimyasal analizi yapıldı. Reaksiyon sonuçları apiweb programı (<https://apiweb.biomerieux.com>, Erişim tarihi: 23.02.2019) veri tabanına girilerek bakterilerin tanımlanması yapıldı.



4. BULGULAR

4.1. DNA Ölçüm Sonuçları

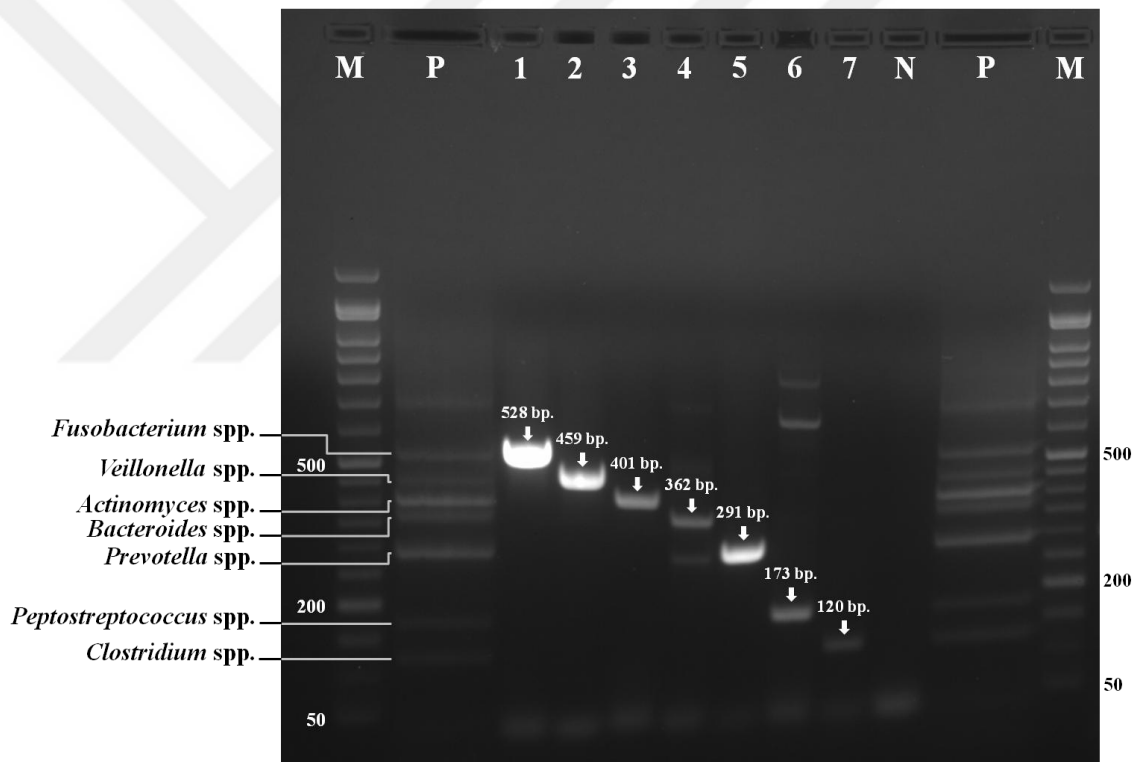
Bakteri suşlarından ve insan kanından Exgene Clinic SV mini Kit (GeneAll Biotechnology, G. Kore) kullanılarak elde edilen DNA'ların 1µl'si nanodrop cihazına (Thermo Scientific, ABD) yüklenerek DNA miktarları ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan DNA'ların ölçüm sonuçları

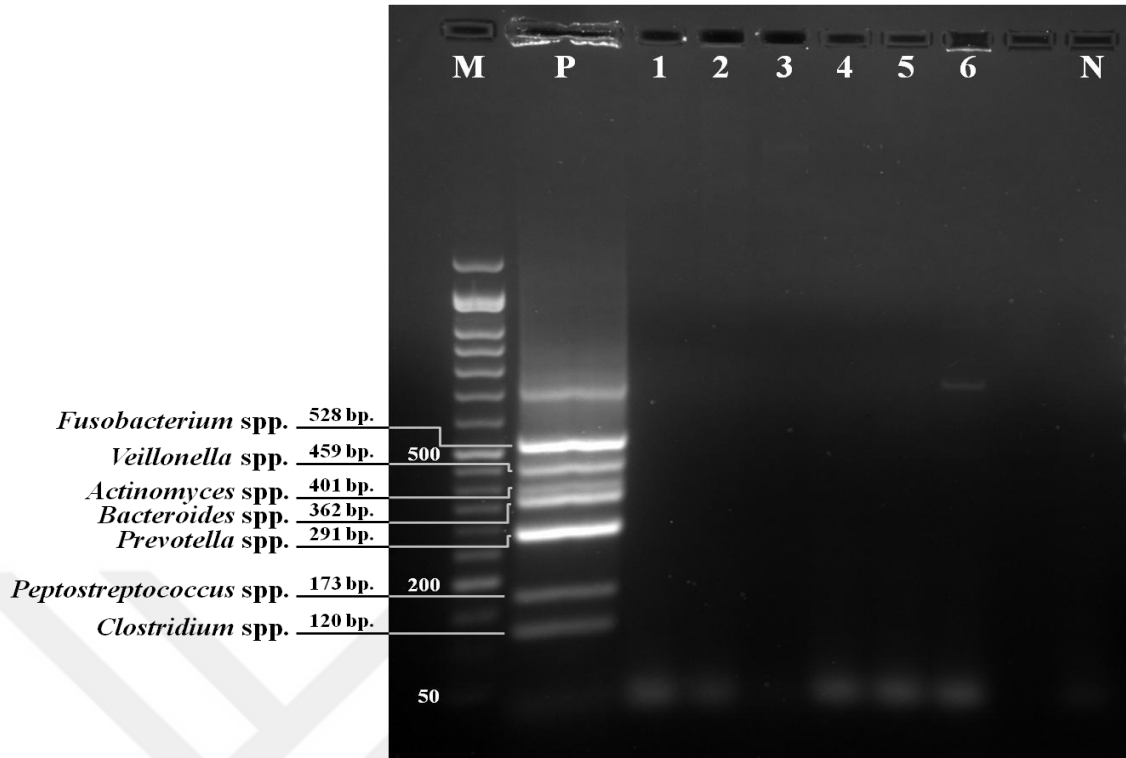
DNA'lar	Ölçüm sonucu (ng/µl)
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	35,8
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	41,1
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	97,4
<i>Clostridium septicum</i> ATCC 12464	286,9
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	31,2
<i>Fusobacterium necrophorum</i> ATCC 25286	19,2
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	21,4
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845	266,6
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611	56,2
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790	31,3
<i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744	12,4
<i>Actinomyces israelii</i> ATCC 12102	11,4
<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 12104	80
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	34,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	75,1
<i>Parvimonas micra</i> ATCC 33270	5,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13,2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	7,1
<i>Homo sapiens</i>	36

4.2. Multiplex PCR Yöntemiyle Primer DNA Dizilerinin Doğrulanması ve Özgüllüklerinin Belirlenmesi

Cinse özgü tasarlanan primer DNA çiftlerinin doğrulanması ve özgüllüklerinin belirlenmesi için hem özgül oldukları bakteri cinsinden hem de çalışmaya dahil edilen diğer bakteri cinslerinden ve insan kanından elde edilen total genomik DNA'lar üzerinde multiplex PCR reaksiyon karışımı ile çalışma yapılmıştır. Pozitif kontrol grubu bakterilerin DNA'ları üzerinde yapılan çalışmanın agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.1'de, negatif kontrol grubu bakterilerin ve insan DNA'ları üzerindeki yapılan çalışmanın agaroz jel elektroforez görüntüleri ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



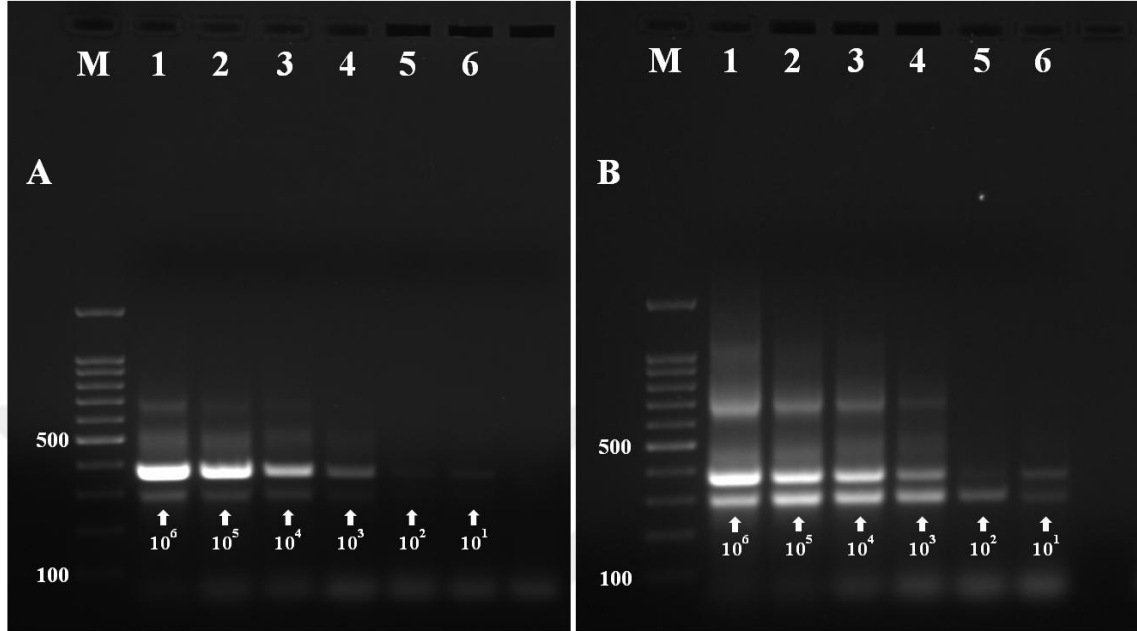
Şekil 4.1. Pozitif kontrol DNA'ları ile yapılan multiplex PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde görünümü. **M**, 50 bp.'lik DNA marker (Genedirex, Tayvan); **P**, Pozitif kontrol; **1**, *Fusobacterium* spp.; **2**, *Veillonella* spp.; **3**, *Actinomyces* spp.; **4**, *Bacteroides* spp.; **5**, *Prevotella* spp.; **6**, *Peptostreptococcus* spp.; **7**, *Clostridium* spp.; **N**, Negatif kontrol (steril distile su).



Şekil 4.2. Negatif kontrol DNA'ları ile yapılan multiplex PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde görünümü. **M**, 50 bp.'lik DNA marker (Genedirex, Tayvan); **P**, Pozitif kontrol; **1**, *Homo sapiens*; **2**, *Escherichia coli*; **3**, *Pseudomonas aeruginosa*; **4**, *Parvimonas micra*; **5**, *Enterococcus faecalis*; **6**, *Staphylococcus aureus*; **N**, Negatif kontrol (steril distile su).

Bu sonuçlara göre negatif kontrol grubu DNA'larında çalışma sonucunu etkileyecek herhangi bir PCR bandı gözlenmezken, pozitif kontrol grubu DNA'larında *Bacteroides* cinsinde 300 bp. ve 700 bp. civarında, *Peptostreptococcus* cinsinde ise 600 bp. ve 800 bp. civarında nonspesifik PCR bandları gözlenmiştir. Agaroz jel üzerinde 528 bp. üzerinde çıkan PCR bandları çalışma sonucunu etkilemediğinden önemsiz kabul edilmiştir. *Bacteroides* cinsinde oluşan yaklaşık 300 bp.'lik zayıf PCR bandının, *Prevotella* cinsine özgü PCR bandı ile aynı seviyede olmasından dolayı PCR sonucunu etkileyebileceği belirlenmiştir. Bu sorunu çözmek için *Prevotella* ve *Bacteroides* cinslerinin 10^6 - 10^1 CFU/ml bakteriye denk gelen seri DNA izolatları elde edilmiştir. Her bir seri dilüsyon tüpünden 1 µl alınarak optimize edilen multiplex PCR test paneli ile ayrı ayrı çalışılmıştır. Çalışma sonucuna göre ortamda sadece *Bacteroides* cinsi varsa 362 bp.'lik spesifik parlak PCR bandı ve 291 bp.'lik nonspesifik zayıf PCR bandı olduğu, ortamda her iki bakterinin olması durumunda ise 362 bp. ve 291 bp.'lik PCR

bandlarının parlaklığının yaklaşık olarak aynı yoğunlukta olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Bacteroides* ve *Prevotella* cinslerinin PCR bandlarının karşılaştırılması. **A**, Sadece *Bacteroides* cinsinin DNA izolatlarının; **B**, Eşit oranda *Bacteroides* ve *Prevotella* cinslerinin DNA izolatlarının multiplex PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde görünümü; **M**, 100 bp.'lik DNA marker (TransGen Biotech, Çin); **1**, 10^6 CFU/ml; **2**, 10^5 CFU/ml; **3**, 10^4 CFU/ml; **4**, 10^3 CFU/ml; **5**, 10^2 CFU/ml; **6**, 10^1 CFU/ml.

4.3. Multiplex PCR Analitik Duyarlılık Sonuçları

Duyarlılık çalışmasına dahil edilen standart suşların 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır ve bunlardan Exgene Clinic SV mini Kit (GeneAll Biotechnology, G. Kore) kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA izolatlarının 1µl'si nanodrop cihazına (Thermo Scientific, ABD) yüklenerek DNA miktarları ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

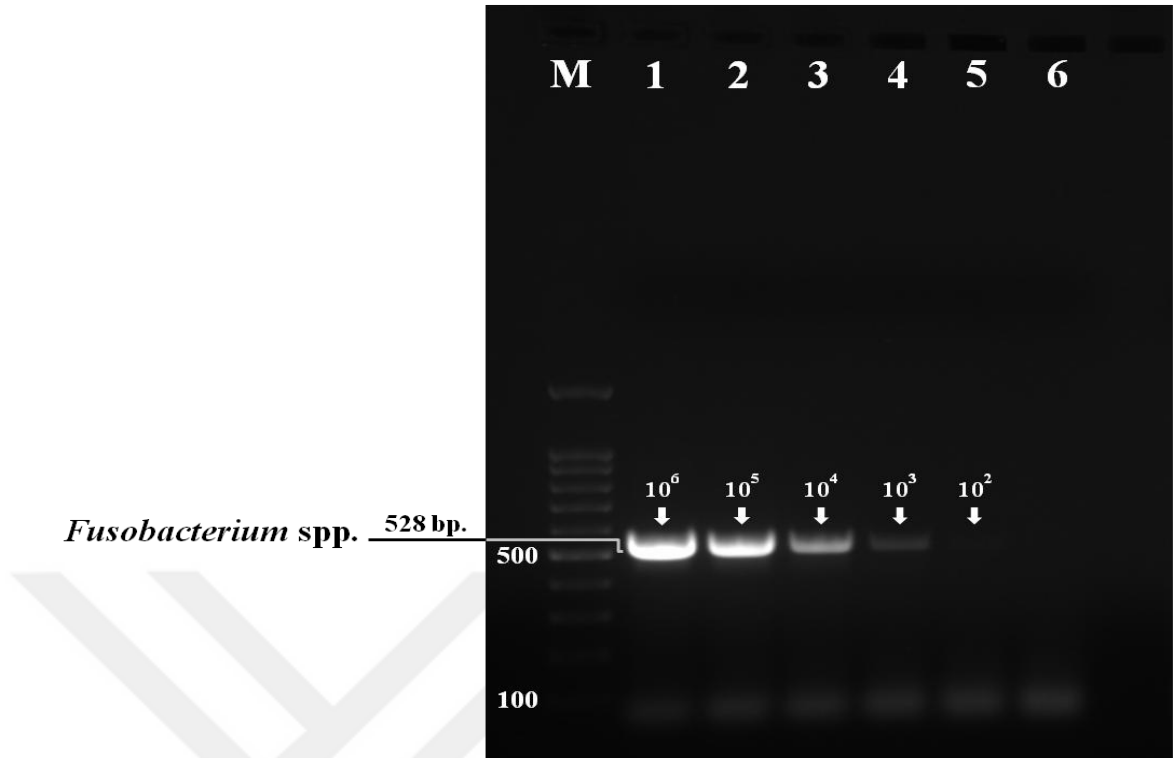
Tablo 4.2. Analitik duyarlılık çalışmasında kullanılan DNA'ların ölçüm sonuçları

DNA'lar	Ölçüm sonucu (ng/μl)
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	18
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	3,7
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	9
<i>Clostridium septicum</i> ATCC 12464	28
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	4,9
<i>Fusobacterium necrophorum</i> ATCC 25286	4,7
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	12,4
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845	7
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611	6,4
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790	11,4
<i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744	7,2
<i>Actinomyces israelii</i> ATCC 12102	7,5
<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 12104	16

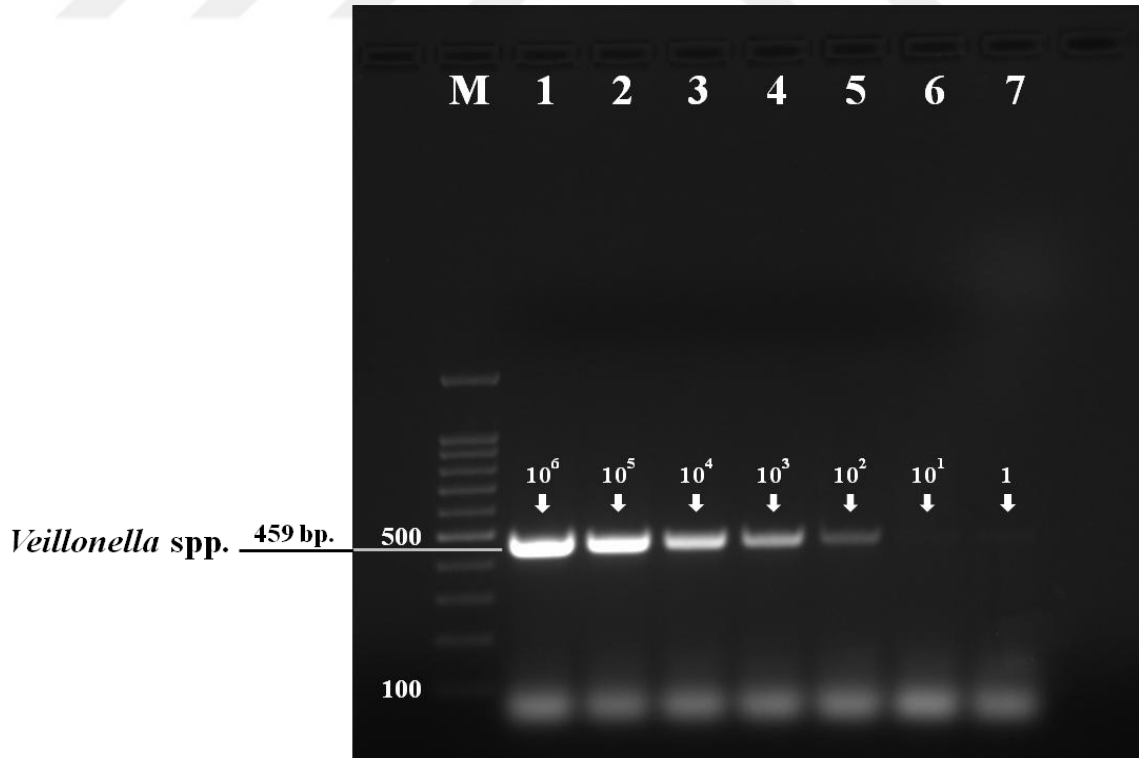
Analitik duyarlılık çalışmalarının agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.4 - 4.10'da, çalışmanın sonuçları ise Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre geliştirilen multiplex PCR panelinin *Veillonella* spp. (1 CFU/ml), *Prevotella* spp. (10^1 CFU/ml), *Peptostreptococcus* spp. (10^1 CFU/ml) ve *Bacteroides* spp. (10^1 CFU/ml) cinslerine duyarlılığının yüksek olduğu, *Clostridium* spp. (10^3 CFU/ml) cinsine ise duyarlılığının en düşük olduğu gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Multiplex PCR paneli analitik duyarlılık sonuçları

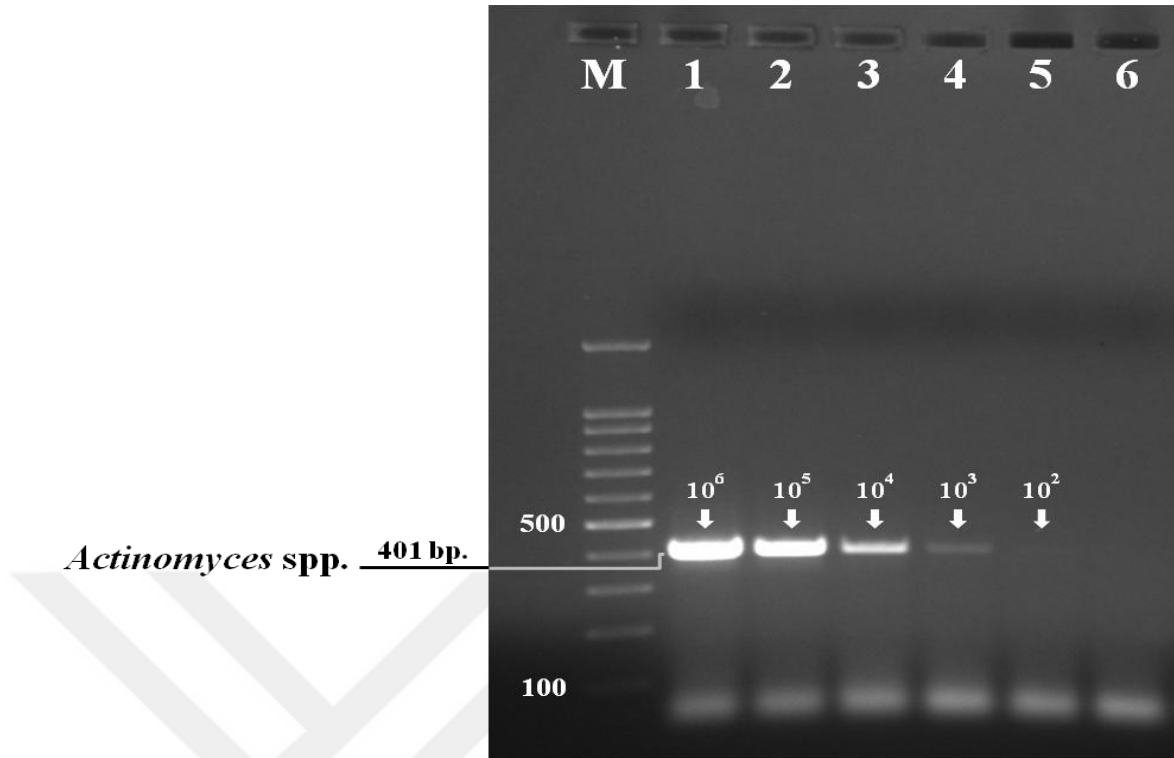
Bakteri Cinsleri	Duyarlılık Sonuçları	
	CFU/ml	DNA (ng/μl)
<i>Veillonella</i> spp.	1	0,0000114
<i>Prevotella</i> spp.	10^1	0,00007
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	10^1	0,000124
<i>Bacteroides</i> spp.	10^1	0,00018
<i>Fusobacterium</i> spp.	10^2	0,00049
<i>Actinomyces</i> spp.	10^2	0,0016
<i>Clostridium</i> spp.	10^3	0,028



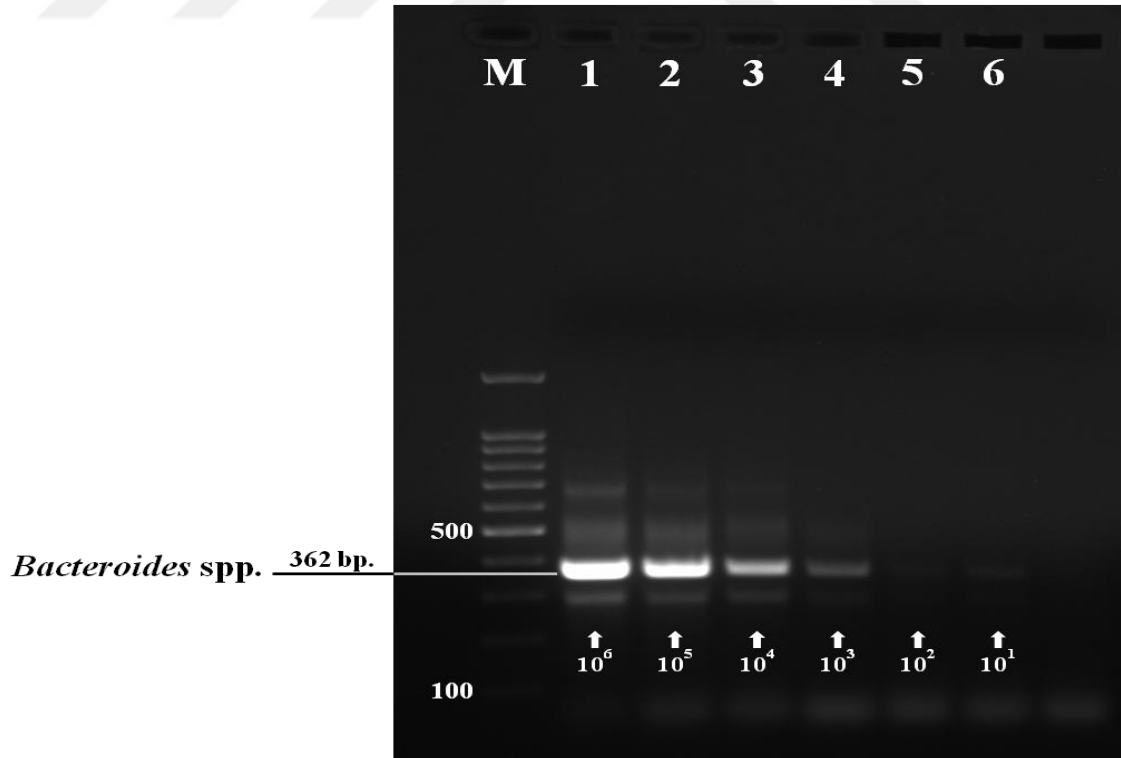
Şekil 4.4. *Fusobacterium* spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M**, 100 bp.'lik DNA marker (TransGen Biotech, Çin); **1**, 10^6 CFU/ml; **2**, 10^5 CFU/ml; **3**, 10^4 CFU/ml; **4**, 10^3 CFU/ml; **5**, 10^2 CFU/ml; **6**, 10^1 CFU/ml.



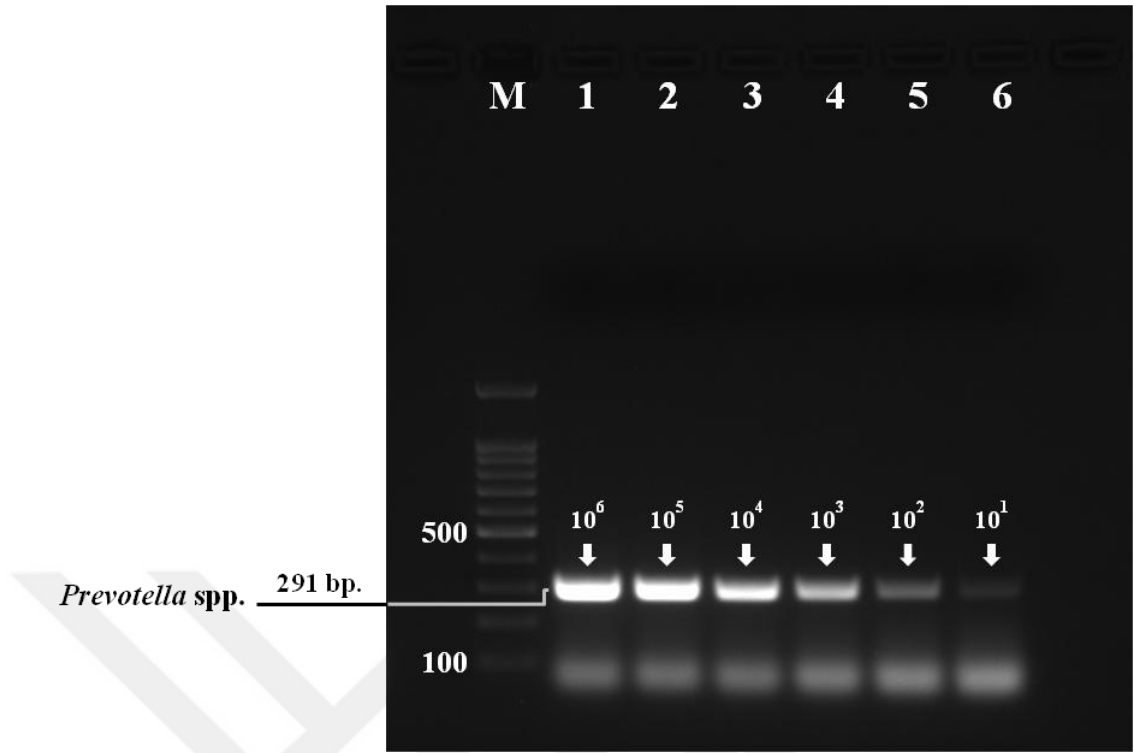
Şekil 4.5. *Veillonella* spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M**, 100 bp.'lik DNA marker (TransGen Biotech, Çin); **1**, 10^6 CFU/ml; **2**, 10^5 CFU/ml; **3**, 10^4 CFU/ml; **4**, 10^3 CFU/ml; **5**, 10^2 CFU/ml; **6**, 10^1 CFU/ml; **7**, 1 CFU/ml.



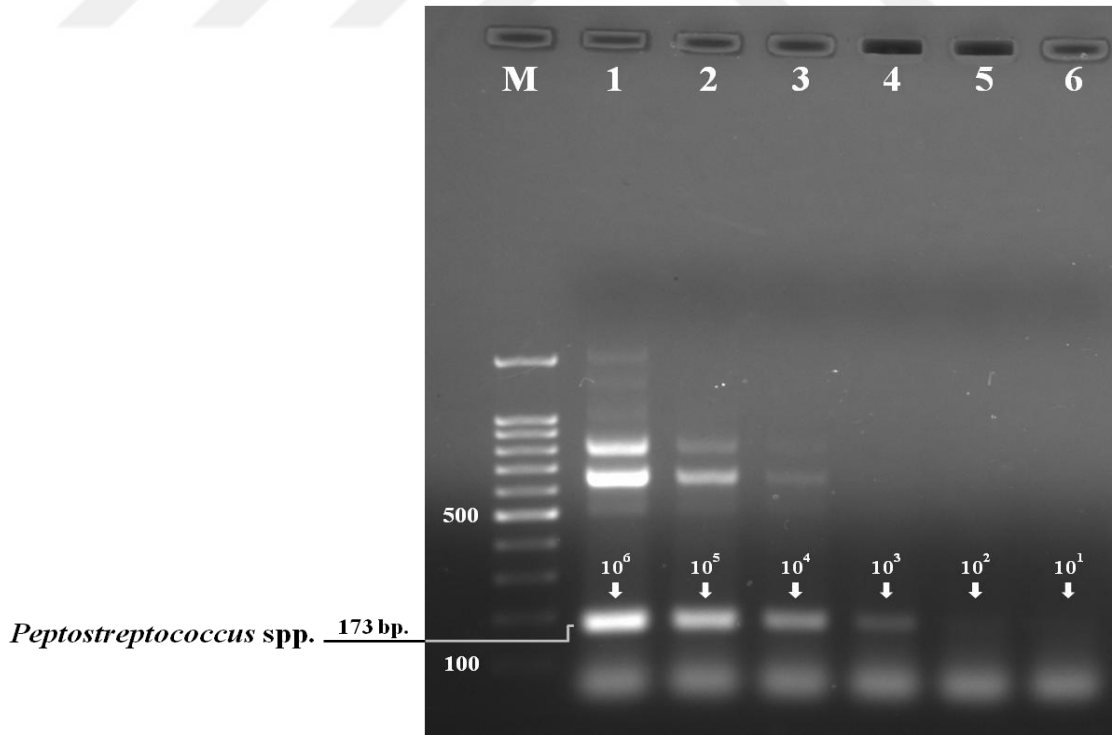
Şekil 4.6. *Actinomyces* spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M**, 100 bp.'lik DNA marker (TransGen Biotech, Çin); **1**, 10^6 CFU/ml; **2**, 10^5 CFU/ml; **3**, 10^4 CFU/ml; **4**, 10^3 CFU/ml; **5**, 10^2 CFU/ml; **6**, 10^1 CFU/ml.



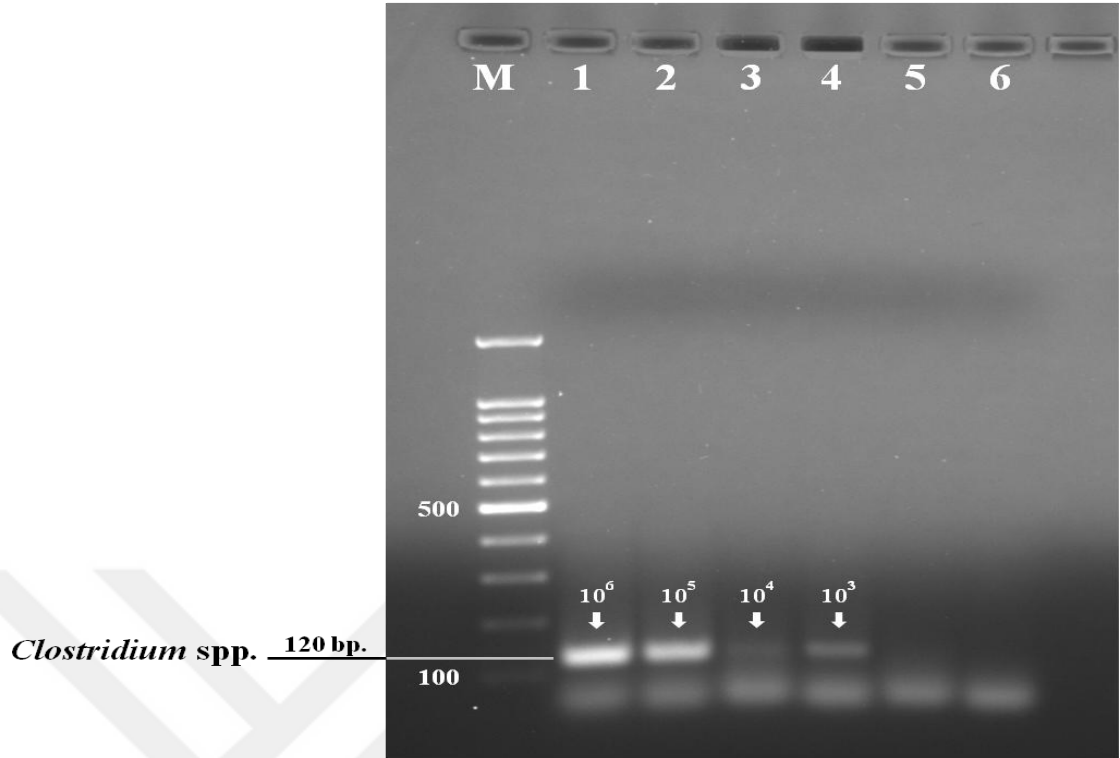
Şekil 4.7. *Bacteroides* spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M**, 100 bp.'lik DNA marker (TransGen Biotech, Çin); **1**, 10^6 CFU/ml; **2**, 10^5 CFU/ml; **3**, 10^4 CFU/ml; **4**, 10^3 CFU/ml; **5**, 10^2 CFU/ml; **6**, 10^1 CFU/ml.



Şekil 4.8. *Prevotella* spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M**, 100 bp.'lik DNA marker (TransGen Biotech, Çin); **1**, 10^6 CFU/ml; **2**, 10^5 CFU/ml; **3**, 10^4 CFU/ml; **4**, 10^3 CFU/ml; **5**, 10^2 CFU/ml; **6**, 10^1 CFU/ml.



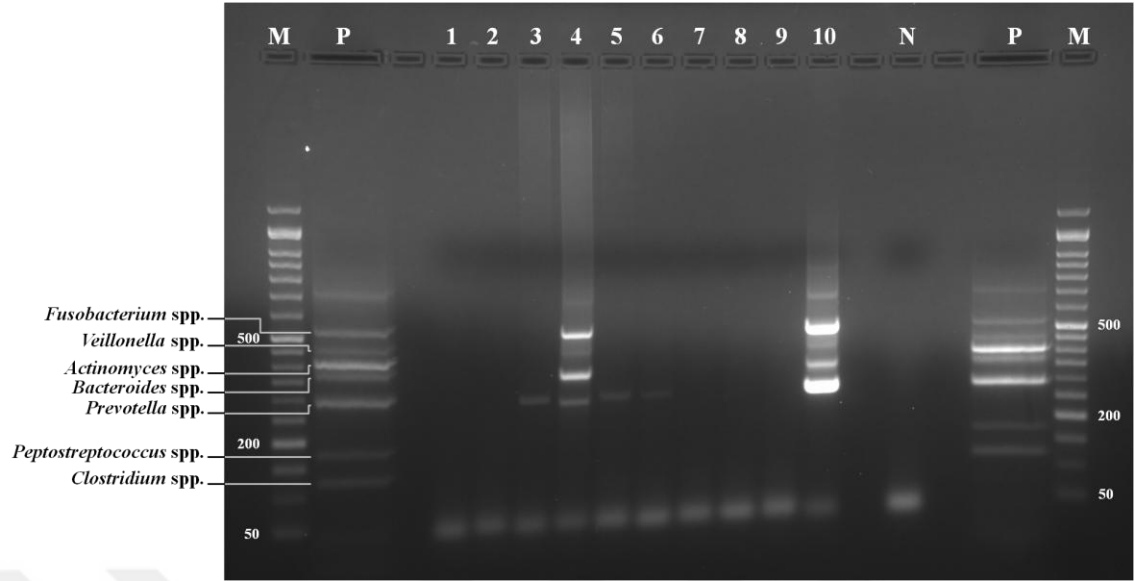
Şekil 4.9. *Peptostreptococcus* spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M**, 100 bp.'lik DNA marker (TransGen Biotech, Çin); **1**, 10^6 CFU/ml; **2**, 10^5 CFU/ml; **3**, 10^4 CFU/ml; **4**, 10^3 CFU/ml; **5**, 10^2 CFU/ml; **6**, 10^1 CFU/ml.



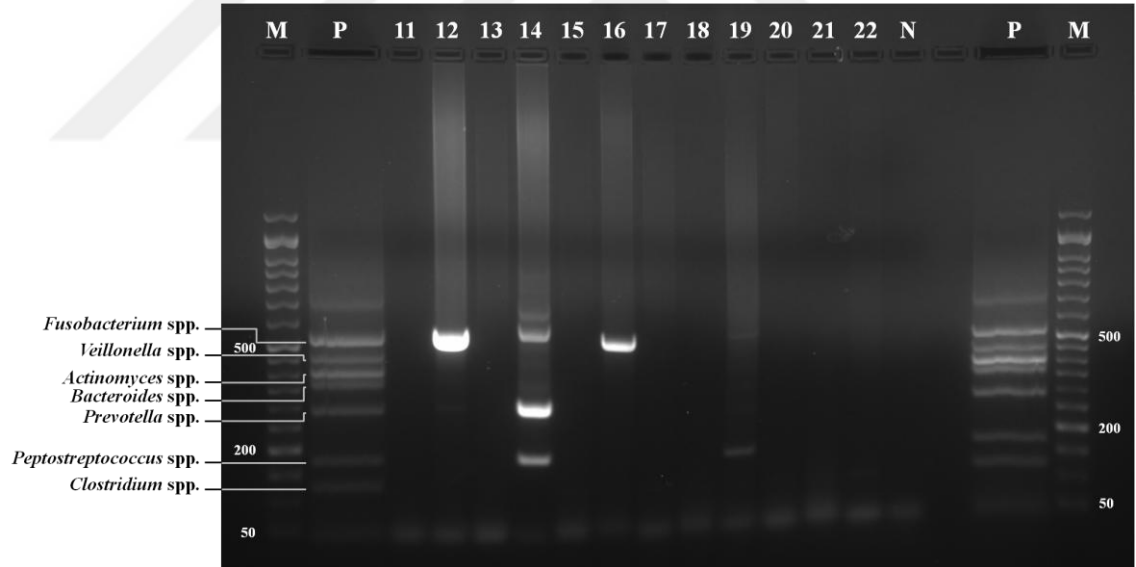
Şekil 4.10. *Clostridium* spp. duyarlılık çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M**, 100 bp.'lik DNA marker (TransGen Biotech, Çin); **1**, 10^6 CFU/ml; **2**, 10^5 CFU/ml; **3**, 10^4 CFU/ml; **4**, 10^3 CFU/ml; **5**, 10^2 CFU/ml; **6**, 10^1 CFU/ml.

4.4. Hasta Örneklerinde Anaerob Bakterilerin Tanımlanması

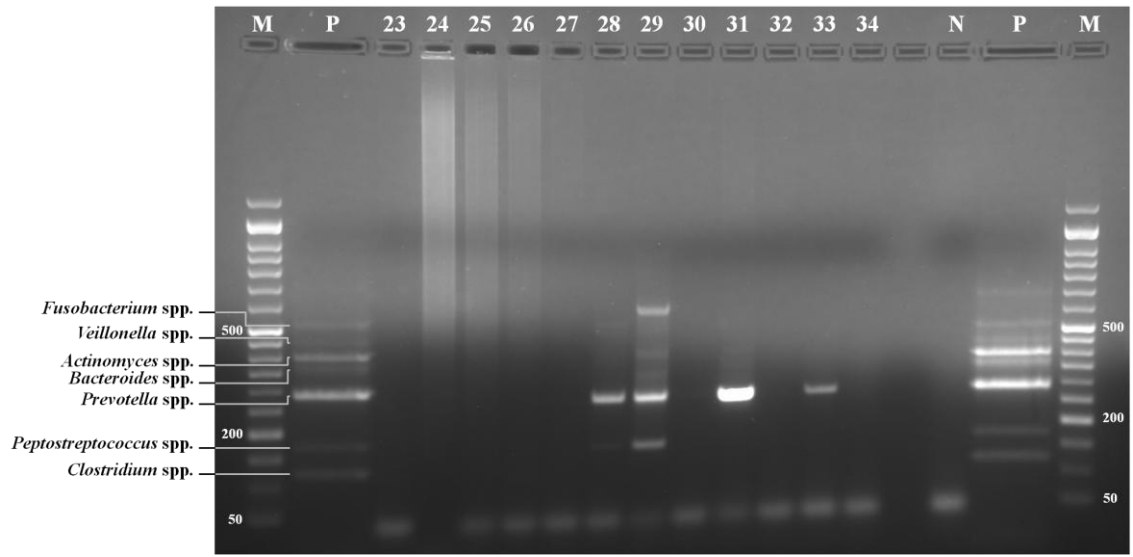
Hasta örneklerinden izole edilen DNA'lar multiplex PCR reaksiyon karışımına eklenerek PCR çalışılmıştır. Hasta örnekleri ile yapılan multiplex PCR testlerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 4.11 - 4.14'de gösterilmiştir.



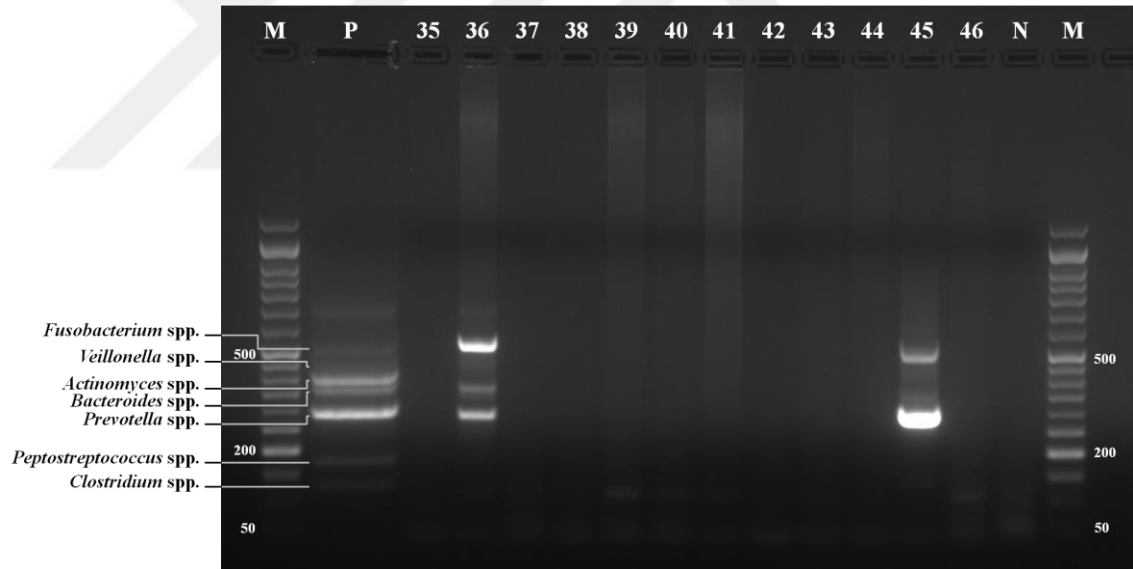
Şekil 4.11. 1-10 no'lu hasta örneklerinin multiplex PCR çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M**, 50 bp.'lik DNA marker (Genedirex, Tayvan); **P**, Pozitif kontrol; **1-10**, Hasta örneklerinin DNA'ları; **N**, Negatif kontrol (steril distile su).



Şekil 4.12. 11-22 no'lu hasta örneklerinin multiplex PCR çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M**, 50 bp.'lik DNA marker (Genedirex, Tayvan); **P**, Pozitif kontrol; **11-22**, Hasta örneklerinin DNA'ları; **N**, Negatif kontrol (steril distile su).



Şekil 4.13. 23-34 no'lu hasta örneklerinin multiplex PCR çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M**, 50 bp.'lik DNA marker (Genedirex, Tayvan); **P**, Pozitif kontrol; **23-34**, Hasta örneklerinin DNA'ları; **N**, Negatif kontrol (steril distile su).



Şekil 4.14. 35-46 no'lu hasta örneklerinin multiplex PCR çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü. **M**, 50 bp.'lik DNA marker (Genedirex, Tayvan); **P**, Pozitif kontrol; **35-46**, Hasta örneklerinin DNA'ları; **N**, Negatif kontrol (steril distile su).

Hasta örneklerinin laboratuvara taşınma şekilleri, Gram boyama, kültür ve multiplex PCR sonuçları Tablo 4.4'de gösterilmiştir. Tabloya göre 46 örneğin 20 (%43,5)'inde multiplex PCR ile bir ya da daha fazla anaerob bakteri pozitif bulunurken, bunların 14'ünde (%70) anaerob üreme olmamış, 6'sında (%30) ise hem anaerob kültür hem de multiplex PCR sonucu pozitif bulunmuştur. Bir örnekte hem aerob hem de anaerob üreme olmuştur.

Tablo 4.4. Hasta örneklerinin taşınma şekilleri ve anaerob bakterilerin tanımlama sonuçları

S.No	Örnek Tipi	Taşınma Şekli	Gram Boyama Sonuç	Aerob Kültür Sonuç	Anaerob Kültür Sonuç	Multiplex PCR Sonuç
1	Plevra Sıvısı	ATB	-	-	-	-
2	Eklemler Sıvısı	ATB	-	-	-	-
3	Apse	ATB	-	-	-	<i>Prevotella</i> spp.
4	Plevra Sıvısı	BKST	-	-	-	<i>Bacteroides</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Veillonella</i> spp.
5	Periton	BKST	-	-	-	<i>Prevotella</i> spp.
6	Apse	ATB	-	<i>E. coli</i> <i>M. morganii</i> ssp. <i>morganii</i>	-	<i>Prevotella</i> spp.
7	Apse	ETB	-	Az Gr (+) kümeli kok	<i>Peptostreptococcus</i> spp.	-
8	Plasenta	ETB	-	-	-	-
9	Kist	BKST	-	-	-	-
10	Apse	Enjektör	Bol Gr (-) basil Az Gr (+) basil	<i>Bacillus</i> spp.	-	<i>Bacteroides</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Veillonella</i> spp.
11	BAL	Enjektör	-	-	-	-
12	Apse	Enjektör	Nadir Gr (-) basil	-	-	<i>Fusobacterium</i> spp. <i>Prevotella</i> spp.
13	Apse	Enjektör	-	<i>E. coli</i>	-	-

14	Yara	Enjektör	Nadir Gr (+) kok	-	Gr (+) kok	<i>Prevotella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp.
15	Yara	Enjektör	-	<i>S. aureus</i>	-	-
16	Yara	Enjektör	-	-	-	<i>Fusobacterium</i> spp.
17	Yara	Enjektör	-	-	-	-
18	Yara	Enjektör	-	-	-	-
19	Apse	Enjektör	Bol Gr (+) kok	-	Gr (-) basil	<i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp.
20	Yara	Enjektör	-	-	-	-
21	Apse	ETB	-	-	-	-
22	Apse	Enjektör	-	<i>Enterococcus</i> spp.	-	<i>Clostridium</i> spp.
23	Yara	Enjektör	-	-	-	-
24	Apse	Enjektör	Nadir Gr (+) kok	<i>S. agalactiae</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-
25	Apse	Enjektör	-	-	-	-
26	Apse	Enjektör	-	-	<i>Propionibacterium acnes</i>	-
27	Apse	Enjektör	-	-	-	-
28	Apse	ETB	-	-	-	<i>Prevotella</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp.
29	Vajinal Akıntı	ETB	-	-	<i>Prevotella</i> spp.	<i>Prevotella</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp.
30	Yara	ETB	-	<i>P. aeruginosa</i>	-	-
31	Apse	ETB	Bol Gr (-) basil	-	<i>Prevotella</i> spp.	<i>Prevotella</i> spp.
32	Yara	ETB	-	-	-	-

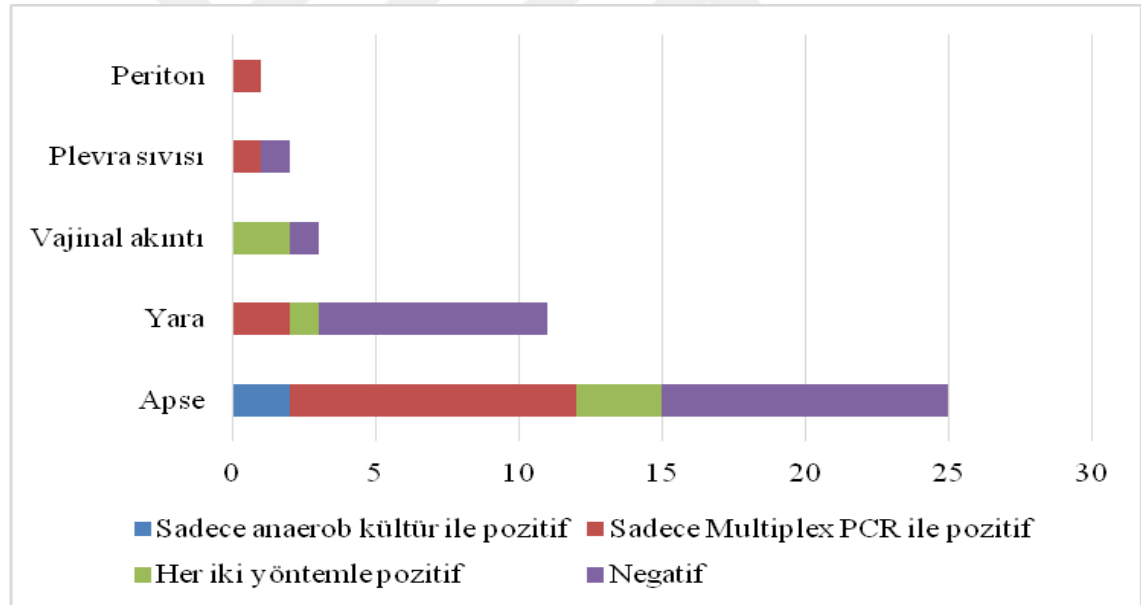
33	Vajinal Akıntı	ETB	-	-	Gr (-) basil Gr (+) kok	<i>Prevotella</i> spp.
34	Vajinal Akıntı	ETB	-	Vajen flora ve maya	-	-
35	Yara	ETB	-	-	-	-
36	Apse	Enjektör	-	-	Gr (+) kok	<i>Fusobacterium</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp.
37	Apse	Enjektör	-	-	-	-
38	Apse	Enjektör	-	-	-	-
39	Yara	Enjektör	-	-	-	<i>Clostridium</i> spp.
40	Apse	Enjektör	-	-	-	<i>Clostridium</i> spp.
41	Apse	Enjektör	-	-	-	<i>Clostridium</i> spp.
42	Apse	Enjektör	-	-	-	-
43	Apse	Enjektör	-	-	-	-
44	Apse	Enjektör	-	-	-	-
45	Apse	BKST	Nadir Gr (-) basil	-	-	<i>Prevotella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp.
46	Apse	ATB	Nadir Gr (+) kok	KNS	-	<i>Clostridium</i> spp.

ATB, Anaerobik taşıma besiyeri; **BAL**, Bronkoalveoler lavaj; **BKST**, Burgu kapaklı steril tüp; **ETB**, Eküvyonlu taşıma besiyeri, **KNS**, Koagülaz negatif Stafilokoklar

Anaerob bakterilerin kültür ve multiplex PCR sonuçlarının örnek türüne göre dağılımı Grafik 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre anaerob kültür için laboratuvara gönderilen örneklerin başında apse (%54,3) ve yara yeri (%23,9) örnekleri yer almıştır.

Hasta örneklerinin 8'inde (%17,4) anaerob bakteri üremesi gerçekleşirken, bunların 5'i (%62,5) apse, 2'si (%25) vajinal akıntı ve 1'i (%12,5) yara yeri örneğinden oluşmuştur. Multiplex PCR testi ile en çok bakteri tanımlamasının yapıldığı hasta örnekleri apse (%65) ve yara yeri (%15) örnekleri olmuştur. BAL, eklem sıvısı, kist ve plasenta örneklerinde ne kültür yöntemiyle ne de multiplex PCR yöntemiyle anaerob bakteri tanımlanamamıştır (Grafik 4.1).

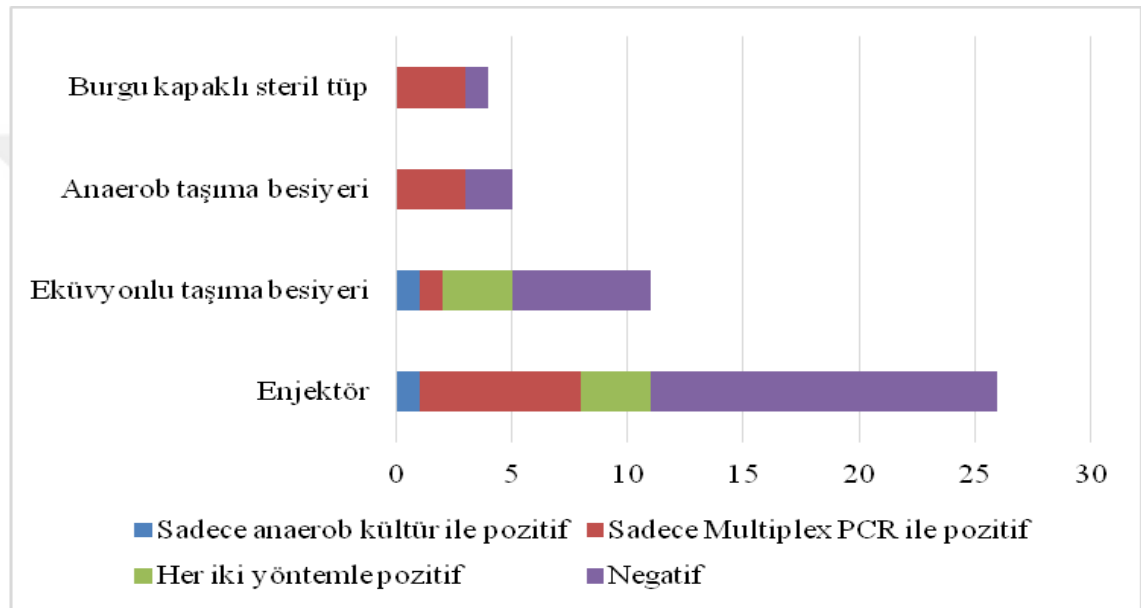
Grafik 4.1. Anaerob bakterilerin kültür ve multiplex PCR sonuçlarının örnek türüne göre dağılımı



Anaerob bakterilerin kültür ve multiplex PCR sonuçlarının örneklerin taşıma şekillerine göre dağılımı Grafik 4.2'de gösterilmiştir. Buna göre anaerob kültür için laboratuvara gönderilen örnekler en çok enjektör (%56,5) ve eküvyonlu taşıma besiyeri (%23,9) ile laboratuvara gönderilmiştir. Anaerob bakteri üremesi olan hasta örneklerinin 4'ü (%50) enjektör ile 4'ü de (%50) eküvyonlu taşıma besiyeri ile laboratuvara gelmiştir. Anaerob taşıma besiyeri (Hardy Diagnostic, ABD) ve burgu kapaklı steril tüp ile laboratuvara gelen örneklerde anaerob bakteri üremesi olmamıştır.

Multiplex PCR paneli ile sırasıyla, enjektör (%50) ile gelen örneklerden, eküvyonlu taşıma besiyeri (%20) ile gelen örneklerden ve anaerob taşıma besiyeri-burgu kapaklı steril tüp (%15) ile gelen örneklerden anaerob bakteri identifikasyonu yapılmıştır (Grafik 4.2).

Grafik 4.2. Anaerob bakterilerin kültür ve multiplex PCR sonuçlarının örneklerin taşıma şekillerine göre dağılımı



Anaerob kültürü pozitif olan hasta örneklerindeki bakteriler, Gram boyama yöntemiyle, VITEK 2 / API 20A tanımlama sistemleriyle ve multiplex PCR yöntemiyle tanımlanmışlardır. Anaerob kültürü pozitif olan 8 hasta örneğinin 4 (%50)'ündeki bakteriler VITEK 2 / API 20A tanımlama sistemleriyle tanımlanırken, tanımlanamayan 4 (%50) örnekteki bakteriler ise Gram boyama özelliklerine göre tanımlanarak sonuç verilmiştir. Multiplex PCR paneli ile ise 8 hasta örneğinin 6 (%75)'sındaki bakteriler tanımlanabilmiştir.

Multiplex PCR paneli ile tanımlanan bakterilerin hasta örneklerine göre dağılımı Tablo 4.5'de gösterilmiştir. Bu tabloda da görüldüğü üzere en çok tanımlanan bakteriler içerisinde ilk sırayı *Prevotella* spp. (%37,1) ve *Fusobacterium* spp. (%22,9) cinsleri alırken bunları *Clostridium* spp. (%14,3), *Peptostreptococcus* spp. (%11,4), *Bacteroides* spp. (%8,6) ve *Veillonella* spp. (%5,7) cinsleri izlemiştir. *Actinomyces* spp. cinsi ise hiçbir örnekte tanımlanamamıştır.

Tablo 4.5. Multiplex PCR paneli ile tanımlanan bakterilerin hasta örneklerine göre dağılımı

Mikroorganizma	Apse	Yara	Plevra sıvısı	Vajinal akıntı	Periton	Toplam (%)
<i>Prevotella</i> spp.	8	1	1	2	1	13 (37,1)
<i>Fusobacterium</i> spp.	5	2	1	-	-	8 (22,9)
<i>Clostridium</i> spp.	4	1	-	-	-	5 (14,3)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	2	1	-	1	-	4 (11,4)
<i>Bacteroides</i> spp.	2	-	1	-	-	3 (8,6)
<i>Veillonella</i> spp.	1	-	1	-	-	2 (5,7)
<i>Actinomyces</i> spp.	-	-	-	-	-	-
Toplam (%)	22 (62,9)	5 (14,3)	4 (11,4)	3 (8,6)	1 (2,9)	35

4.5. Geleneksel Mikrobiyolojik Yöntemler ile Multiplex PCR Panelinin Karşılaştırılması

Multiplex PCR panelinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri hesaplanırken Gram boyama yöntemi ve kültür yöntemi referans test olarak kullanılmıştır. Hesaplamalarda aşağıdaki formüller kullanılmıştır (Parikh ve ark., 2008).

- Duyarlılık = Gerçek pozitif (GP) / (Yanlış Negatif (YN) + GP) x 100
- Özgüllük = Gerçek Negatif (GN) / (Yanlış Pozitif (YP) + GN) x 100
- Pozitif Prediktif Değer = GP / (GP + YP) x 100
- Negatif Prediktif Değer = GN / (GN + YN) x 100

Referans test olarak Gram boyama yöntemi baz alındığında multiplex PCR panelinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %100, %65, %30 ve %100 olarak bulunmuştur (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Gram boyama sonuçlarına göre multiplex PCR panelinin değerlerinin hesaplanması.

Multiplex PCR Sonucu	Gram Boyama (Referans Test)		Toplam
	Pozitif Örnek	Negatif Örnek	
PCR Pozitif	6 (GP)	14 (YP)	20
PCR Negatif	0 (YN)	26 (GN)	26
Toplam	6 (GP+YN)	40 (YP+GN)	46

Gram boyama ile multiplex PCR panelinin sonuçlarının karşılaştırılması yapıldığında 8 örneğin 6'sı birbirini doğrularken, 24 ve 46 no'lu örneklerin Gram boyama sonuçları aerob kültür sonuçlarıyla benzer bulunmuştur. Buna göre klinik örneklerden yapılan Gram boyama sonuçları ile multiplex PCR panelinin sonuçları benzer bulunmuştur (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Gram boyama sonuçları ile multiplex PCR panelinin sonuçlarının karşılaştırılması

S.No	Örnek Tipi	Gram Boyama Sonuç	Multiplex PCR Sonuç	Aerob Kültür Sonuç
10	Apse	Bol Gr (-) basil Az Gr (+) basil	<i>Bacteroides</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Veillonella</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
12	Apse	Nadir Gr (-) basil	<i>Fusobacterium</i> spp. <i>Prevotella</i> spp.	-
14	Yara	Nadir Gr (+) kok	<i>Prevotella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp.	-
19	Apse	Bol Gr (+) kok	<i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp.	-
24	Apse	Nadir Gr (+) kok	-	<i>S. agalactiae</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>K. oxytoca</i>
31	Apse	Bol Gr (-) basil	<i>Prevotella</i> spp.	-
45	Apse	Nadir Gr (-) basil	<i>Prevotella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp.	-
46	Apse	Nadir Gr (+) kok	<i>Clostridium</i> spp.	KNS

Referans test olarak anaerob kültür sonuçları baz alındığında multiplex PCR panelinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %75, %63,2, %30 ve %92,3 bulunmuştur (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Anaerob kültür sonuçlarına göre multiplex PCR panelinin değerlerinin hesaplanması.

Multiplex PCR Sonucu	Kültür Sonucu (Referans Test)		Toplam
	Pozitif Örnek	Negatif Örnek	
PCR Pozitif	6 (GP)	14 (YP)	20
PCR Negatif	2 (YN)	24 (GN)	26
Toplam	8 (GP+YN)	38 (YP+GN)	46

Anaerob kültür sonuçları ile multiplex PCR panelinin sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 4.12'de gösterilmiştir. Tabloya göre 8 örneğin 5'i birbiri ile uyumluyken, 7, 26 ve 36 no'lu örnekler uyumlu bulunmamıştır. 26 no'lu örnekte tanımlanan *Propionibacterium acnes* bakterisi multiplex PCR panelinde yer almadığından tanımlanamamıştır. 36 no'lu örnekteki Gram (+) kok morfolojisi multiplex PCR panelindeki sonuçlarla uyumlu çıkmamıştır. 7 no'lu örnekteki *Peptostreptococcus* spp. multiplex PCR panelinde yer almasına rağmen tanımlanamamıştır. Bu sonuçlara göre anaerob kültür sonuçları ile multiplex PCR paneli sonuçları %62,5 oranında uyumlu bulunmuştur.

7 ve 36 no'lu örneklerin fenotipik sonuçlarının multiplex PCR panelinin sonucu ile uyumlu olmamasının nedenini araştırmak için farklı bir Gram pozitif anaerob kok (GPAK) olan ATCC 33270 *Parvimonas micra*'nın kültürü yapılarak API 20A ve VITEK 2 cihazıyla fenotipik olarak, multiplex PCR paneliyle ise moleküler olarak tanımlama işlemine alınmıştır. VITEK 2 bu kültürü %92 olasılıkla *Peptostreptococcus anaerobius* olarak (Şekil 4.15), API 20A ise *Peptococcus niger* olarak sonuçlandırırken (Şekil 4.16), multiplex PCR paneli ile yapılan çalışmada ise her hangi bir PCR bandı görülmemiştir. Bu sonuç API 20A'nın ve VITEK 2 tanımlama sistemlerinin GPAK'ları tam olarak tanımlayamadıklarını ve dolayısıyla 7 no'lu örnekteki bakterinin *Peptostreptococcus* spp. olma ihtimalinin düşük olduğunu, 36 no'lu örnekteki bakterinin ise *Peptostreptococcus* spp.'den farklı bir GPAK olma ihtimalinin yüksek olduğunu göstermiştir.

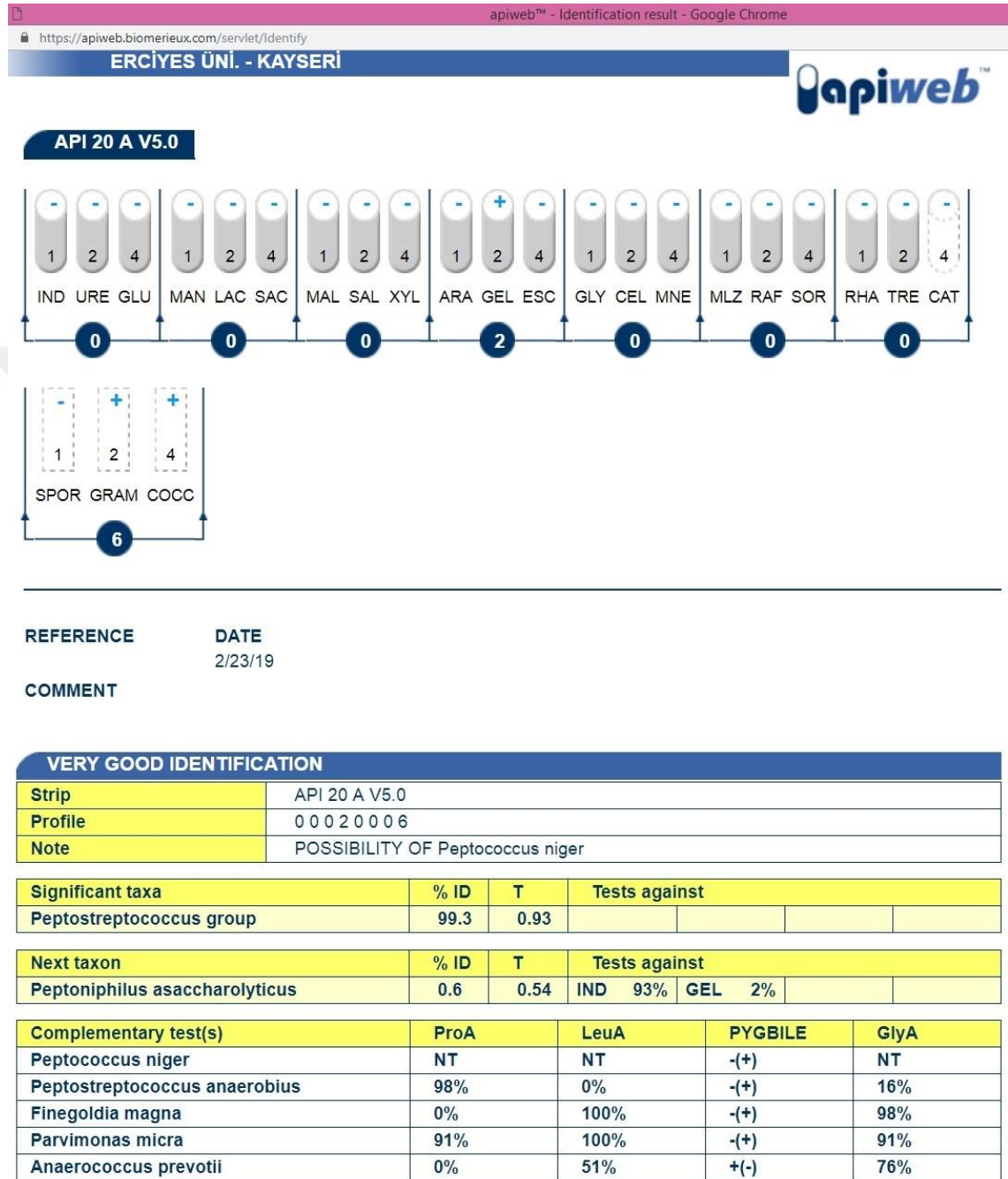
Ayrıca bu sonuç birbirine çok yakın olan *Parvimonas* ve *Peptostreptococcus* cinslerini birbirinden ayırdığı için projede geliştirilen multiplex PCR panelinin *Peptostreptococcus* cinsine karşı özgüllüğünün yüksek olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.9. Anaerob kültür sonuçları ile multiplex PCR panelinin sonuçlarının karşılaştırılması

No	Örnek Tipi	Anaerob Kültür Sonuç	Multiplex PCR Sonuç
7	Apse	<i>Peptostreptococcus</i> spp.	-
14	Yara	Gr (+) kok	<i>Prevotella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp.
19	Apse	Gr (-) basil	<i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp.
26	Apse	<i>Propionibacterium acnes</i>	-
29	Vajinal Akıntı	<i>Prevotella</i> spp.	<i>Prevotella</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp.
31	Apse	<i>Prevotella</i> spp.	<i>Prevotella</i> spp.
33	Vajinal Akıntı	Gr (-) basil Gr (+) kok	<i>Prevotella</i> spp.
36	Apse	Gr (+) kok	<i>Fusobacterium</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp.

Erciyes Univ																	
bioMérieux Müşterisi: Sistem No:	Laboratuvar Raporu	25.Şub.2019 04:16 VET sayfa yazdırıldı Yazdıran: Labadmin															
Hasta Adı: İzolat: m olcu-1 (Nitelikli)	Hasta ID:																
Kart Türü: ANC Barkod: 2440811203519758 Test Cihazı: 00001925E827 (16952) Ayar Tekn: Laboratory Administrator(Labadmin)																	
Biyonomara: 0600001000103 Organizma Miktarı: Seçilen Organizma: Peptostreptococcus anaerobius																	
Yorumlar:																	
İdentifikasyon Bilgileri																	
Kart:	ANC	Lot No: 2440811203															
Tamamlandı:	22.Şub.2019 14:43 VET	Durum: Son															
		Son Kullanım Tarihi: 15.Şub.2020 12:00 VET Analiz Zamanı: 6,27 saat															
Organizma Kaynağı	VITEK 2																
Seçilen Organizma	92% Olasılık Peptostreptococcus anaerobius Biyonomara: 0600001000103 Uyum: İyi identifikasyon																
SRF Organizması																	
Ayrılabacak Analiz Organizmaları ve Testler:																	
Analiz Mesajları:																	
Uyumsuz Olan Tipik Biopattern(ler) Peptostreptococcus anaerobius PyrA(3),PHOS(1),																	
Biyokimyasal Detaylar																	
4	dGAL	-	5	LeuA	-	6	ELLM	-	7	PheA	-	8	ProA	+	10	PyrA	+
11	dCEL	-	13	TyrA	-	15	APPA	-	18	dGLU	-	20	dMNE	-	22	dMAL	-
28	SAC	-	30	ARB	-	33	NAG	-	34	BGLUi	-	36	URE	-	37	BGURi	-
39	BGALi	(+)	41	AARA	-	42	AGALi	-	43	BMAN	-	44	ARG	-	45	PVATE	-
51	MTE	-	53	ESC	-	54	BdFUC	-	55	BNAGi	-	56	AMANi	-	57	AIFUC	-
59	PHOS	+	60	IARA	-	61	dRIB2	-	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
	GRAM	+		MORPH	+		AERO	-									
Yüklü VITEK 2 Systems Sürümü: 08.01 MIK Yorum Rehberi: AES Parametre Seti Adı:																	
Terapötik Yorum Rehberi: AES Parametresinin Son Değiştirilme Tarihi:																	
Sayfa 1 / 1																	

Şekil 4.15. ATCC 33270 *Parvimonas micra* kültürünün VITEK 2 sonuç raporu



Şekil 4.16. ATCC 33270 *Parvimonas micra* kültürünün API 20A sonuç raporu

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan vücudunun neredeyse tüm yüzeyleri normal flora olarak adlandırılan mikroorganizmalar tarafından kolonize edilmiştir. Anaerob bakteriler üst solunum yolları, gastrointestinal ve ürogenital sistem mikrobiyotasının önemli bir kısmını oluştururlar. Normal şartlar altında konağa yararlı olan bu mikroorganizmalar, konak savunmasının bozulması gibi uygun şartların oluşması durumunda ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler (Hentges, 1993; Külekçi ve Topcuoğlu, 2011; Brook, 2017).

Anaeroblar vücudun hemen hemen her organında veya dokusunda enfeksiyöz süreçlerde tek başlarına ya da aerob bakterilerle birlikte yer alabilirler. Anaeroblar çoğu klinik örnekten izole edilebilir ancak anaerobların örneklerden izolasyonu zordur ve çoğunlukla gözden kaçırılır (Fader, 2019). Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için klinik örneklerden anaerobların tanımlanması önem arz etmektedir. Klinik örneklerden en sık izole edilen anaeroblar; *Bacteroides fragilis* grubu, *Fusobacterium* türleri, pigmentli Gram-negatif çomaklar (*Prevotella* ve *Porphyromonas*), anaerob Gram pozitif koklar (genellikle *Peptostreptococcus*) ve *Clostridium* türleridir (Brook, 1988; Külekçi ve Topcuoğlu, 2011).

Özel üreme gereksinimleri olan bu bakterilerin klinik örneklerden izolasyonu ve tanımlanmaları oldukça güç ve zaman alıcı olsa da kültür altın standarttır. Klinik örneklerden izole edilen anaerob bakteriler, Dünya genelinde ağırlıklı olarak kültüre dayalı konvansiyonel yöntemler ve ticari biyokimyasal tanımlama sistemleri ile tanımlanmaya çalışılmaktadır. Bu yöntemlerle yapılan çalışmalarda klinik örneklerden en çok Gram negatif anaerobların izole edildiği görülmektedir.

Marchand-Austin ve ark. (2014) Kanada'da geleneksel biyokimyasal yöntemler kullanarak 2527 anaerobik bakteri izole etmişlerdir. Çalışmada en sık izole edilen bakteri cinsleri sırasıyla *Bacteroides* spp. (%16,5), *Actinomyces* spp. (%14,9), *Clostridium* spp. (%14,1) ve *Propionibacterium* spp. (%10,2) olurken diğer bakteriler *Fusobacterium* spp. (%5,9), *Prevotella* spp. (%4), *Veillonella* spp. (%1,1) ve *Peptostreptococcus* spp. (%0,3) olmuştur.

Glupczynski ve ark. (2009) Belçika'da konvansiyonel yöntemler ve Rapid IDTM ANA II panel (Remel Europe, Dartford, UK) kiti ile çeşitli örneklerden 333 anaerob bakteri izole etmişlerdir. Çalışmada en sık izole edilen bakteri cinsleri sırasıyla *Bacteroides* spp. (%42) ve *Prevotella* spp. (%24) olurken *Fusobacterium* spp. (%7), *Clostridium* spp. (%6), *Peptostreptococcus* spp. (%4,8), *Actinomyces* spp. (%0,6) ve *Veillonella* spp. (%0,3) cinsleri de izole edilmiştir.

Kuveyt genelinde yapılan bir çalışmada çeşitli örneklerden konvansiyonel yöntemler, Api 20A (bioMérieux) ve gaz-likid kromatografi (Gas chromatography, Chrompak, CP001) yöntemleri kullanılarak 2557 anaerob bakteri izolatu tanımlanmıştır. Çalışmada tanımlanan cinsler; *Bacteroides* spp. (%53,3), *Prevotella* spp. (%20,8), *Peptostreptococcus* spp. (%19,4), *Fusobacterium* spp. (%2,9) ve *Clostridium* spp. (%1) olmuştur (Jamal ve ark., 2010).

Sheikh ve ark. (2015) Pakistan'da konvansiyonel yöntemler ve Api 20A (bioMérieux) kiti kullanarak çeşitli örneklerden 121 anaerob bakteri izole etmişlerdir. Çalışmada izole edilen bakteri cinsleri sırasıyla *Bacteroides* spp. (%55,4), *Clostridium* spp. (%26,4), *Peptostreptococcus* spp. (%11,6), *Prevotella* spp. (%5) ve *Fusobacterium* spp. (%0,8) olmuştur.

Yeni Zelanda'da yapılan bir çalışmada çeşitli klinik örneklerden 384 anaerob bakteri izole edilmiştir. Çalışmada *Bacteroides* spp. (%30,2), *Clostridium* spp. (%14,3), *Prevotella* spp. (%12,4), *Fusobacterium* spp. (%12,9), *Peptostreptococcus* spp. (%5,5) ve *Veillonella* spp. (%2,5) izole edildiği bildirilmiştir (Roberts ve ark., 2006).

Aldridge ve ark. (2001) Amerika'da dört farklı merkezde izole edilen 556 anaerob bakteriyi konvansiyonel yöntemler ve gaz-likid kromatografi yöntemleri kullanarak tanımlamışlardır. Çalışmada tanımlanan bakteriler; *Bacteroides* spp. (%72,1), *Prevotella* spp. (%11,7), *Fusobacterium* spp. (%4), *Porphyromonas* spp. (%3,4) ve *Peptostreptococcus anaerobius* (%1,1) olmuştur.

Güney Kore'de yapılan bir çalışmada Api Rapid ID 32A ve VITEK 2 (bioMérieux) tanımlama sistemlerini kullanarak çeşitli klinik örneklerden 274 anaerobik bakteri izole edilmiştir. Çalışmada, *Bacteroides* spp. (%52,6), *Clostridium* spp. (%11,7), *Prevotella* spp. (%5,5), *Veillonella* spp. (%4,4), *Actinomyces* spp. (%0,7) ve *Peptostreptococcus* spp. (%0,4) saptanmıştır (Lee ve ark., 2015).

Kierzkowska ve ark. (2014) organ nakli olan hastalardan alınan 87 klinik örnekten toplam 104 anaerob bakteri suşu izole etmişlerdir. Konvansiyonel biyokimyasal testler ve Api 20A (bioMérieux) kiti kullanılarak tanımlanan bakteri cinslerinin oranları; *Peptostreptococcus* spp. (%39,4), *Bacteroides* spp. (%20,2), *Prevotella* spp. (%7,6), *Veillonella* spp. (%3,8), *Fusobacterium* spp. (%2,9), *Actinomyces* spp. (%2,9) ve *Clostridium* spp. (%1) şeklinde bulunmuştur.

Kosta Rika'da yapılan on yıllık bir çalışmada çeşitli klinik örneklerden toplanan 1010 anaerob bakteri suşu Rapid ID 32A ve Api 20A (bioMérieux) tanımlama kitleri ile tiplendirilmiştir. Çalışmada izole edilen bakteriler, *Bacteroides* spp. (%25,5), *Clostridium* spp. (%9,5), *Propionibacterium* spp. (%9,1), *Prevotella* spp. (%4,3), *Peptostreptococcus* spp. (%3,9), *Veillonella* spp. (%3,4), *Fusobacterium* spp. (%3,3) ve *Actinomyces* spp. (%2,5) olmuştur (Rodríguez-Cavallini ve ark., 2011).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda, Kuru ve Ozyurt (2008) 322 klinik örnekten konvansiyonel yöntemler ve Api 20A (bioMérieux) kiti kullanarak 60 anaerob bakteri izole etmişlerdir. Çalışmada, *Bacteroides* spp. (%48,3), *Prevotella* spp. (%10), *Fusobacterium* spp. (%8,3), *Peptostreptococcus* spp. (%5), *Clostridium* spp. (%3,3), *Veillonella* spp. (%1,7) ve *Actinomyces* spp. (%1,7) saptanmıştır. Şengöz ve ark. (2005) yedi yıl boyunca çeşitli klinik örneklerden (n:1503) topladıkları 127 anaerobik bakteriyi konvansiyonel biyokimyasal testler ve Api Rapid ID32A (bioMérieux) kiti ile tanımlamışlardır. Çalışmada izole edilen bakteriler, *Bacteroides* spp. (%47,2), *Peptostreptococcus* spp. (%29,1), *Clostridium* spp. (%4,7), *Prevotella* spp. (%3,2), *Actinomyces* spp. (%3,2), *Veillonella* spp. (%1,6) ve *Fusobacterium* spp. (%0,8) şeklinde olmuştur. Uysal ve ark. (2014) yedi yıllık araştırmalarında 543 klinik örnekten izole ettikleri 134 anaerob bakteriyi BBL Crystal System (BectonDickinson, USA) kitini kullanarak tiplendirmişlerdir. Çalışmada en fazla üreyen bakteri cinslerinin *Bacteroides* spp. (%29,9), *Peptostreptococcus* spp. (%23,1) ve *Propionibacterium* spp. (%20,2) olduğunu bildirmişlerdir.

Anaerob bakterilerin tanımlanmasında konvansiyonel sistemlerin yanı sıra gelişen veritabanıyla birlikte MALDI-TOF MS tanımlama sistemlerinin de kullanımı gün geçtikçe artmaya başlamıştır. MALDI-TOF MS tanımlama sistemleri ile yapılan çalışmalarda da klinik örneklerden en çok Gram negatif anaerobların tanımlandığı görülmektedir.

Veloo ve van Winkelhoff (2015) MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik) yöntemini kullanarak klinik örneklerden 799 anaerob bakteri tanımlamışlardır. Üç yıllık çalışmada izole edilen bakteri cinsleri sırasıyla; *Bacteroides* spp. (%35,4), GPAK (%31,2), *Prevotella* spp. (%15,4), *Clostridium* spp. (%7,8), *Fusobacterium* spp. (%4,9) ve *Veillonella* spp. (%2,4) olmuştur.

Wybo ve ark. (2014) Belçika'da yaptıkları çok merkezli bir araştırmada MALDI-TOF MS (Microflex LT, Bruker Daltonik) yöntemini kullanarak çeşitli örneklerden 403 anaerob bakteri tanımlamışlardır. En sık izole edilen bakteriler; *Bacteroides* spp. (%42,4), *Prevotella* spp. (%11,2) ve *Clostridium* spp. (%9,4) olurken bunları *Fusobacterium* spp. (%5,2), *Peptostreptococcus* spp. (%3,5), *Veillonella* spp. (%2) ve *Actinomyces* spp. (%1) takip etmiştir.

Barreau ve ark. (2013) Fransa'da MALDI-TOF MS (Microflex LT, Bruker Daltonik) yöntemini kullanarak çeşitli örneklerden 1325 anaerob bakteri tanımlamışlardır. En sık izole edilen bakteriler; *Propionibacterium* spp. (%28,6) ve *Bacteroides* spp. (%22,8) olurken *Fusobacterium* spp. (%6,6), *Prevotella* spp. (%6,1), *Clostridium* spp. (%3,3), *Veillonella* spp. (%2,2) ve *Peptostreptococcus* spp. (%0,7) cinsleri de tanımlanmıştır.

Veloo ve ark. (2018) Avrupa'da yaptıkları çok merkezli bir araştırmada MALDI-TOF MS (Biotyper, Bruker Daltonik) yöntemini kullanarak çeşitli örneklerden 6309 anaerob bakteri tanımlamışlardır. Çalışmada, *Bacteroides* spp. (%14,8), *Prevotella* spp. (%9,2), *Actinomyces* spp. (%4,9), *Fusobacterium* spp. (%4,8), *Veillonella* spp. (%3,8), *Clostridium* spp. (%3,6) ve *Peptostreptococcus* spp. (%2,1) cinslerini saptamışlardır.

Jeverica ve ark. (2017) Slovenya'da MALDI-TOF MS (Microflex LT, Bruker Daltonik) yöntemini kullanarak çeşitli örneklerden 2673 anaerob bakteri tanımlamışlardır. En sık izole ettikleri bakteriler; *Bacteroides* spp. (%31) ve *Prevotella* spp. (%14) olurken diğerleri *Fusobacterium* spp. (%7), *Clostridium* spp. (%7), *Actinomyces* spp. (%4), *Veillonella* spp. (%3) ve *Peptostreptococcus* spp. (%2) olmuştur.

Moleküler yöntemler, klinik mikrobiyoloji laboratuvarının kültür temelli yöntemlere bağımlılığını azaltmıştır. Birçok örnekte anaerobik etken, kültür ile izole edilememesine rağmen, moleküler yöntemlerle tespit edilebilir ve tanımlanabilir. Diğer yöntemlere göre daha hızlı, güvenli, duyarlı ve özgül olması nedeniyle moleküler yöntemlerin laboratuvarlardaki kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Moleküler yöntemlerle yapılan

çalışmalarda incelendiğinde diğerk yöntemlere benzer olarak klinik örneklerden en çok Gram negatif anaerobların tanımlandığı görölmektedir.

Coltella ve ark. (2013) İtalya'da bir çocuk hastanesinde 16S rRNA sekans analizi (MicroSeq, Applied Biosystems) ile 318 çocuktan alınan klinik örnekten 484 anaerob bakteri tanımlamışlardır. Çalışmada tür bazında en çok *C. difficile* (%70) tanımlanırken klinik örneklerden tanımlanan cinsler, *Bacteroides* spp. (%7,4), *Clostridium* spp. (*C. difficile* hariç) (%7), *Propionibacterium* spp. (%4,3), *Prevotella* spp. (%3,5), *Fusobacterium* spp. (%1,7), *Peptostreptococcus* spp. (%1,4), *Veillonella* spp. (%1,4) ve *Actinomyces* spp. (%0,5) olmuştur.

Simmon ve ark. (2008) Amerika'da kültürden izole edilen 316 anaerobik bakteriyi geriye dönük olarak 16S rRNA sekans analizi yöntemi ile tanımlamışlardır. Tanımlanan bakteri cinsleri ve oranları, *Bacteroides* spp. (%40,8), *Clostridium* spp. (%30,7), *Fusobacterium* spp. (%4,7), *Prevotella* spp. (%3,5) ve *Veillonella* spp. (%1,3) şeklinde sonuçlanmıştır.

Yunoki ve ark. (2017) Japonya'da yaptıkları çok merkezli bir araştırmada 16S rRNA sekans analizi metodunu kullanarak çeşitli örneklerden 526 anaerob bakteri tanımlamışlardır. Çalışmada en yaygın izole edilen cins *Bacteroides* spp. (%40) olurken diğerk tanımlanan cinsler *Prevotella* spp. (%8,3), *Clostridium* spp. (%7,7), *Peptoniphilus* spp. (%7,7), *Fingoldia* spp. (%4,1), *Fusobacterium* spp. (%2,3), *Peptostreptococcus* spp. (%2,1) ve *Veillonella* spp. (%1,2) olmuştur.

Ng ve ark. (2008) diyabetik ayak enfeksiyonlarında, Api 20A (bioMérieux) kiti ve 16S rRNA sekans analizi metodu kullanarak 102 anaerobik bakteri tiplendirmişlerdir. Çalışmada en sık tiplendirilen bakteriler *Peptostreptococcus* spp. (%47), *Bacteroides* spp. (%19) ve *Prevotella* spp. (%17) olurken diğerk tanımlanan cinsler *Veillonella* spp. (%4), *Clostridium* spp. (%2) ve *Fusobacterium* spp. (%2) olmuştur.

Perçin ve Ekincioğlu (2012) 136 örnekten 74 anaerob bakteriyi multiplex PCR (FC Biotek, Türkiye) kiti ile tanımlamışlardır. Çalışmada en çok *Bacteroides* spp. (%17,6), *Fusobacterium* spp. (%14,9) ve *Prevotella* spp. (%5,3) cinslerini tiplendirdiklerini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, geliştirilen multiplex PCR paneliyle 46 örneğin 20'sinden (%43,5) 35 anaerob bakteri cins düzeyinde tanımlanmıştır. Bunların %74,3'ünü Gram negatif

anaeroblar, %25,7'sini Gram pozitif bakteriler oluşturmuştur. En sık izole edilen Gram negatif anaeroblar *Prevotella* spp. (%37,1) ve *Fusobacterium* spp. (%22,9) olurken bunları sırasıyla *Bacteroides* spp. (%8,6) ve *Veillonella* spp. (%5,7) izlemiştir. Gram pozitif anaeroblardan ise *Clostridium* spp. (%14,3) ve *Peptostreptococcus* spp. (%11,4) saptanmıştır. Multiplex PCR panelinde yer almasına rağmen *Actinomyces* spp. hiçbir örnekten izole edilememiştir. Yukarıdaki çoğu çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızda da multiplex PCR ile en sık olarak Gram negatif anaerob basiller (%68,6) tanımlanırken bunu sırasıyla Gram pozitif anaerob basiller (%14,3), Gram pozitif anaerob koklar (%11,4) ve Gram negatif anaerob koklar (%5,7) izlemiştir. Bununla birlikte *Bacteroides* spp. benzer çalışmalara göre çok daha düşük bir oranda gözlenmiştir.

Çalışmamızda 46 örneğin 8'inde (%17,4) anaerob üreme olmuş ve bunlardan konvansiyonel yöntemler ile 9 anaerob bakteri izole edilmiştir. VITEK 2 (bioMérieux) ile tanımlanan 4 izolatın 3'ü cins düzeyinde, 1'i tür düzeyinde tiplendirilmiştir. Geri kalan 5 izolat ise Gram boyanma özelliklerine göre tanımlanmıştır. VITEK 2'nin tanımladığı izolatlar *Prevotella* spp. (n:2), *Peptostreptococcus* spp. (n:1) ve *Propionibacterium acnes* (n:1) olmuştur. Genel itibariyle izolatları Gram boyama özelliklerine göre değerlendirdiğimizde 9 izolatın %44,4'ünü Gram pozitif anaerob koklar, %44,4'ünü Gram negatif anaerob basiller ve %11,2'ini ise Gram pozitif anaerob basiller oluşturmuştur.

Anaerobların izole edilmeleri zahmetli olduğu gibi çoğu zaman da identifikasyonları yapılamamaktadır. Uygun tedavinin zamanında uygulanamaması klinik başarısızlıklara neden olabilmektedir. Anaerob bakterilerin izolasyonu için, örneklerin alınması, taşınması ve ekim yöntemlerinin uygun şekilde yapılması önemlidir (Brook, 2016). Örneklerin taşınmasına özen gösterildiğinde hemen hemen her enfeksiyon bölgesinden anaeroblar izole edilebilir. Bununla birlikte, anaerobik organizmalar en sık apse boşluklarında veya nekrotik dokularda bulunurlar (Zaleznik ve Kasper, 1989).

Glupczynski ve ark. (2009) 333 anaerob izolatı en çok karın bölgesinden (%19,2), yara/irinden (%18,6) ve apseden (%17,1) izole etmişlerdir. Fransa'da yapılan bir çalışmada MALDI-TOF MS yöntemi kullanarak izole edilen 1325 anaerobik izolatı en çok kan kültürü (%27,3), doku biyopsisi (%24,1), apse ve vücut sıvısı (%21,7) örneklerinden izole etmişlerdir (Barreau ve ark., 2013). Shore ve ark. (1999) yedi yıllık

araştırmalarında izole ettikleri 357 anaerob izolatın çoğunu kan (%39,2), apse (%22,4) ve yumuşak doku (%13,4) örneklerinden elde etmişlerdir. Wybo ve ark. (2014) MALDI-TOF MS yöntemi kullanarak izole ettikleri 403 anaerobik izolatın çoğunluğunu karın bölgesi (%38), yara/irin (%16), apse (%15) ve kan (%10) örneklerinden izole etmişlerdir. Shenoy ve ark. (2017) beş yıllık araştırmalarında anaerob kültürü yapılan 2227 örneğin %12,5'inden (n:278) 336 anaerob bakteri (ort. 1,2 izolat/örnek) izole etmişlerdir. Suşları ağırlıklı olarak apse (%23,9), diyabetik ayak (%20) ve nekrotizan fasiit (%15,6) örneklerinden elde etmişlerdir. Rodríguez-Cavallini ve ark. (2011) anaerob kültürü yapılan 1061 örneğin %48,8'inden (n:518) 1010 anaerob bakteri (ort. 1,9 izolat/örnek) izole etmişlerdir. Suşları çoğunlukla intraabdominal (%28,1), genitoüriner sistem (%21,4), deri-yumuşak doku-kemik (%21,1) ve apse (%18,8) örneklerinden izole etmişlerdir.

İspanya'da yapılan bazı çalışmalarda, Barba ve ark. (2014) MALDI-TOF MS yöntemini kullanarak izole ettikleri 135 anaerob bakterinin en çok kan kültürü (%64,4) ve apse (%26,7) örneklerinden ürediklerini bildirmişlerdir. Rodríguez-Sánchez ve ark. (2016) 201 klinik örnekten tanımladıkları 295 anaerob (ort. 1,5 izolat/örnek) izolatı, en çok apse (%27,9), yumuşak doku (%20,9) ve yara (%14,9) örneklerinden izole etmişlerdir. Farklı bir çalışmada Cobo ve ark. (2019) MALDI-TOF MS yöntemi kullanarak 243 örnekten 276 anaerobik bakteri (ort. 1,1 izolat/örnek) izole etmişler ve bu izolatların çoğunluğunu abdominal apselerden (%32), dışkı örneklerinden (*C. difficile*) (%18,1), cilt ve yumuşak dokulardan (%17,6) ve ürogenital bölgelerden (%10,6) izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Türkiye'de yapılan bazı çalışmalarda, Durmaz ve Taştekin (1997) anaerob işleme alınan 91 örneğin %44'den (n:40) 65 anaerob bakteri (ort. 1,6 izolat/örnek) izole etmişlerdir. İzolatların çoğunu apse (%38,5), intraabdominal (%20) ve eklem sıvısı (%15,4) örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir. Ercis ve ark. (2005) 367 klinik örneğin %28'inden (n:103) 217 anaerob bakteri (ort. 2,1 izolat/örnek) saptamışlardır. İzolatları en çok püy (%47), apse (%24,4) ve doku (%10,6) örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bozkurt ve ark. (2004) 238 örneğin %28,2'sinden (n:67) 39 anaerob bakteri (ort. 1,7) izole etmişlerdir. İzolatları en çok kan (%28), endometrium (%20,5) ve yara (%12,8) örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir. Doğan ve Baysal (2010) anaerob işleme alınan 100 klinik örneğin %14'ünden 22 anaerob bakteri (ort. 1,6

izolat/örnek) izole etmişlerdir. Anaerob bakterileri apse (%57) ve periton mayi (%42) örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir. Uysal ve ark. (2014) anaerob işleme alınan 543 örneğin %24,6'sından 134 anaerob bakteri izole etmişlerdir. İzolatların çoğunu apse (%44,8) ve yara (%22,4) örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda anaerob kültür işlemine alınan 46 klinik örneğin %17,4'ünde 9 anaerob bakteri üremiştir. Üreme olan her bir örnekten konvansiyonel yöntemlerle ortalama 1,1 bakteri tanımlanmıştır. Anaerob üreme en çok apse (%62,5) örneklerinde olmuştur. Klinik örnekler, geliştirilen multiplex PCR paneli ile analiz edildiğinde ise 46 örneğin %43,5'inden 35 anaerob bakteri tanımlanmıştır. Multiplex PCR ile anaerob bakteri tanımlanan her bir örnekten ortalama 1,8 bakteri tanımlanmıştır. Multiplex PCR ile anaeroblar en çok apse (%62,9) ve yara (%14,3) örneklerinden tanımlanmıştır. Konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde genel olarak anaeroblar en sık apse ve yara örneklerinden izole edildiği görülmektedir, bizim çalışmamızdaki veriler hem ülkemizdeki hem de yurt dışındaki çalışmalarla benzer bulunmuştur. Ayrıca bu sonuçlara göre multiplex PCR ile anaerob bakteri saptanan örnek sayısı konvansiyonel yöntemlere göre 2,5 kat daha fazla olmuş, tanımlanan anaerob bakteri sayısı ise 3,9 kat daha fazla olmuştur.

Anaerob kültürün başarısını, örneklerin alındığı yer ve alınma şekli, laboratuvara taşınma şekli ve laboratuvardaki identifikasyon aşamaları etkilemektedir. Çalışmamızda 46 örneğin %56,5'i enjektör, %23,9'u eküvyonlu taşıma besiyeri, %10,9'u anaerob taşıma besiyeri ve %8,7'si steril tüp ile laboratuvara ulaştırılmıştır. Kültüründe üreme olan 8 örneğin 4'ü enjektör (%50), 4'ü de eküvyonlu taşıma besiyeri (%50) ile laboratuvara ulaşmıştır. Diğer taşıma sistemleri ile gelen örneklerde üreme olmaması dikkat çekicidir. Anaerob örneklerin laboratuvara taşınmasında kullanılması için bazı kliniklere hazır anaerob taşıma besiyeri dağıtılmasına rağmen çalışma süresince işleme aldığımız sadece 5 örnek bu taşıma sistemiyle laboratuvara gelmiştir. Anaerob taşıma besiyeri ile yeterince örnek gelmediği için bu taşıma şeklinin üreme üzerine etkisi yeterince araştırılamamıştır.

Multiplex PCR ile pozitif bulunan 20 örneğin %50'si enjektör, %20'si eküvyonlu taşıma besiyeri, %15'i anaerob taşıma besiyeri-burgu kapaklı steril tüp ile laboratuvara ulaşmıştır. Çalışmamızda anaerob örneklerin kültürdeki üreme oranının düşük çıkması ve multiplex PCR ile üreme olmayan örneklerde de anaerob bakteri saptanmış olması

bize anaerob kültür aşamalarının tekrar gözden geçirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Anaeroblar genellikle anaerob ve fakültatif anaerob bakterilerin birlikte katıldıkları mikst enfeksiyonlara neden olurlar, ancak tek başına etken oldukları enfeksiyonlarda vardır (Tunçkanat, 2008a; Cohen-Poradosu ve Kasper, 2015; Brook, 2017; Fader, 2019).

Sheikh ve ark. (2015) anaerob kültür işlemine alınan 121 örneğin %60'ında monomikrobiyal, %40'ında ise polimikrobiyal üreme olduğunu ve polimikrobiyal enfeksiyonlarda anaeroblara en çok eşlik eden aerobların *E. coli* (%7,5) ve *Streptococcus milleri* (%7,2) olduğunu bildirmişlerdir. Tan ve ark. (2017) işleme alınan anaerob kan kültürü örneklerinin %57'sinde polimikrobiyal, %43'ünde ise monomikrobiyal üreme olduğunu, polimikrobiyal bakteriyemilere en çok eşlik eden aerob bakterilerin, *Enterobacteriaceae* (%29) üyeleri, koagülaz negatif stafilocoklar (%11), *Enterococcus* türleri (%7) ve Anginosus grubu streptokoklar (%7) olduğunu bildirmişlerdir. İspanya'da yapılan bir çalışmada 711 anaerobik bakteriyemi vakasının %65,5'inde monomikrobiyal ve %34,5'inde ise polimikrobiyal üreme olduğu, polimikrobiyal üremede anaeroblara eşlik eden mikroorganizmaların, Gram negatif aerobik bakteriler (%42,4), Gram pozitif aerobik bakteriler (%22,7) ve *Candida* spp. (%2) olduğu rapor edilmiştir (Vena ve ark., 2015). Shenoy ve ark. (2017) 278 örneğin %47,1'inde polimikrobiyal anaerob-aerob, %10,1'inde polimikrobiyal anaerob ve %42,8'inde ise monomikrobiyal anaerob bakteri üremesi olduğunu ve polimikrobiyal üremelerde anaeroblara en çok eşlik eden aerobların *E. coli* (%32,8) ve *Klebsiella pneumoniae* (%23,7) olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *B. fragilis* grubu bakterilerin (%35,9) aerobik bakteriyel patojenlerle birlikte polimikrobiyal enfeksiyonlarda bulunan en yaygın anaerobik bakteri olduğunu rapor etmişlerdir. Cobo ve ark. (2019) *C. difficile* suşlarını göz ardı ettiklerinde enfeksiyonların %53,7'inin polimikrobiyal anaerob-aerob ve %7'sinin ise polimikrobiyal anaerob enfeksiyon şeklinde sonuçlandığını bildirmişlerdir. Ngo ve ark. (2013) Kanada'da 904 klinik örneğin %74,1'inde monomikrobiyal anaerob, %22,5'inde polimikrobiyal anaerob-aerob ve %3,3'ünde polimikrobiyal anaerob bakteri üremesi olduğunu ve polimikrobiyal enfeksiyonlarda anaeroblara en çok eşlik eden aerobların *Enterobacteriaceae* (%43) üyelerinin,

streptokokların (%15), enterokokların (%12) ve stafilokokların (%8) olduğunu bildirmişlerdir.

Türkiye'de yapılan bazı çalışmalarda, Ercis ve ark. (2005) anaerob kültürü yapılan 367 örneğin %7,6'sında monomikrobiyal anaerob, %20,5'inde polimikrobiyal anaerob-aerob üreme olduğunu saptamışlardır. Uysal ve ark. (2014) anaerob kültürü yapılan 543 örneğin %11,1'inde monomikrobiyal anaerob, %13,5'inde polimikrobiyal anaerob-aerob üreme olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada Kiremitçi ve ark. (2008) anaerob kültürü yapılan 243 örneğin %5,8'inde sadece anaerob, %7,8'inde ise anaerob-aerob bakteri ürediğini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda anaerob kültürü yapılan 46 örneğin 6'sında (%13) monomikrobiyal anaerob, 1'inde (%2,2) polimikrobiyal anaerob-aerob ve 1'inde de (%2,2) polimikrobiyal anaerob üreme olmuştur. Multiplex PCR paneli ile yaptığımız analizlerde 46 örneğin 11'inde (%23,9) monomikrobiyal anaerob, 9'unda (%19,6) ise polimikrobiyal anaerob bakteri tespit edilmiştir. Multiplex PCR paneli ile tespit ettiğimiz bakterileri, aerob kültür sonuçları ile birlikte değerlendirdiğimizde 46 örneğin 8'inde (%17,4) monomikrobiyal anaerob, 8'inde (%17,4) polimikrobiyal anaerob ve 4'ünde (%8,7) ise polimikrobiyal anaerob-aerob bakteri tespit edilmiştir. Polimikrobiyal enfeksiyonlarda anaeroblara eşlik eden aerobların *E. coli* (n:1, %20), *Morganella morganii* (n:1, %20), *Bacillus* spp. (n:1, %20), *Enterococcus* spp. (n:1, %20) ve KNS (n:1, %20) olduğu bulunmuştur.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde anaerob bakterileri en hassas ve doğru olarak moleküler yöntemlerin tespit ettiği görülmektedir. Moleküler yöntemleri sırasıyla MALDI-TOF MS yöntemi ve ticari biyokimyasal yöntemler izlemektedir. Moleküler yöntemlerin diğer yöntemlere göre canlı mikroorganizmaya gereksinim duymaması, daha hızlı sonuç vermesi, yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olması bu yöntemlerin tercih edilmesine neden olmaktadır (Aksu, 2011; Gönüllü, 2015; Emery ve ark., 2016).

Fedorko ve ark. (2012) NIH (National Institutes of Health) klinik merkezinde hasta örneklerinden izole edilmiş 152 anaerobik izolatı 16S rDNA sekans analizi (MicroSeq, Applied Biosystems) ile tanımlamışlar ve aynı izolatları MALDI-TOF MS (Microflex LT, Bruker Daltonik) ile test etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre MALDI-TOF MS tarafından 152 anaerob izolatın %86'sı tür düzeyinde, %89'u ise cins düzeyinde doğru olarak tanımlandığı rapor edilmiştir.

Amerika'da yapılan çok merkezli bir çalışmada VITEK MS (bioMérieux) sonuçları, 16S rRNA sekans analizi (MicroSeq, Applied Biosystems) sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Çalışmada 11 cins ve 26 ayrı türü içeren 651 anaerobik izolat analiz edilmiştir. Sonuçlara göre VITEK MS sistemi tarafından 651 izolatın %91,2'si tür düzeyinde, %92,5'nin cins düzeyinde doğru olarak tanımladığı, %7,5'nin ise tespit edilemediği rapor edilmiştir (Garner ve ark., 2014).

Handal ve ark. (2015). Norveç'te kan kültürlerinden izole edilen 197 anaerobik izolatı MALDI-TOF MS (Biotyper, Bruker Daltonik) ve 16S rRNA sekans analizi (MicroSEC, Life Technologies) ile tanımlamışlar ve elde edilen sonuçları karşılaştırmışlardır. 16S rRNA sekans analizine göre MALDI-TOF MS'in, 197 anaerobik izolatın %94,9'unu cins seviyesinde, %86,8'ini tür seviyesinde tanımladığı bildirilmiştir.

Lee ve ark. (2015) çeşitli klinik örneklerden izole edilen 274 anaerobik izolatın 16S rRNA sekans analizi sonucuna göre aynı izolatların VITEK MS (bioMérieux) ve Api Rapid ID 32A / VITEK 2 (bioMérieux) sonuçları karşılaştırmışlardır. VITEK MS, veritabanında bulunmayan 25 izolatı tür seviyesinde tespit edemediğinden, sonuçları veritabanında bulunan 249 izolata göre değerlendirmişlerdir. Sonuçlara göre VITEK MS'in, 249 izolatın %83,9'unu tür seviyesinde, %91,2'sini cins seviyesinde tanımladığı, %8,8 izolatı ise tanımlayamadığı bildirilmiştir. Api Rapid ID 32A / VITEK 2 ticari biyokimyasal tanımlama sistemlerinin tanımlayamadığı 38 izolatın 14'ünü VITEK MS'in tanımladığını ve bu sonuçlara göre de VITEK MS'in ticari biyokimyasal sistemlerden daha iyi performans gösterdiği rapor edilmiştir.

İspanya'da yapılan bir çalışmada 295 anaerobik izolat, MALDI-TOF MS (Microflex LT, Bruker Daltonik) ve Rapid ID 32A (bioMérieux) sistemleri tarafından analiz edilmiş ve her iki yönteminin sonuçları, 16S rRNA sekans analizi yönteminin sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre MALDI-TOF MS, izolatların %85,5'ini tür seviyesinde, %97'sini cins seviyesinde tanımlamış, %3'ünü ise tanımlayamamıştır. Rapid ID 32A kitinin ise izolatların %49,8'ini tür seviyesinde, %78,6'sını cins seviyesinde tanımladığı 63 (%21,4) izolatı ise tanımlayamadığı bildirilmiştir (Rodríguez-Sánchez ve ark., 2016).

Xiao ve ark. (2016). Çin'de çok merkezli yaptıkları çalışmada çeşitli örneklerden izole edilen 85 anaerobik izolatı ve 5 standart anaerobik suşu, 16S rRNA sekans analizi (Takara Biotechnology, Çin), VITEK 2 (bioMérieux) ve VITEK MS (bioMérieux)

tanımlama sistemleri ile tiplendirerek sonuçları karşılaştırmışlardır. Beş standart anaerob suşun her üç sistem tarafından tür düzeyinde doğru olarak tanımlandığı gösterilmiştir. Çalışmada 16S rRNA sekans analizi ile 85 izolatın %97,6'sı tür düzeyinde, %100'ü ise cins düzeyinde tanımlanmıştır. VITEK 2 ile 85 izolatın %61,1'nin tür düzeyinde, VITEK MS'in ise %81,2'sinin tür düzeyinde 16S rRNA ile tutarlı olduğu bulunmuştur. Üç yöntemin hepsinde 90 anaerob izolatın 54'ü (%60) için tutarlı olduğu ve 16S rRNA sekans analizi sonuçlarına göre, VITEK MS sisteminin sonuçlarının, VITEK 2 sisteminin sonuçlarından daha tutarlı olduğu bildirilmiştir.

Lee ve ark. (2011) Hollanda'da çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri 301 anaerobik izolatı, 16S rRNA sekans analizi ile tiplendirmişler ve VITEK 2 (bioMérieux) sonuçları ile karşılaştırmışlardır. 16S rRNA sekans analiz sonucuna göre VITEK 2, izolatların %60,1'ini tür seviyesinde, %79,4'ünü cins seviyesinde doğru olarak tanımladığı belirtilmiştir. Çalışmada, 301 izolatın 100'ünün VITEK 2 veri tabanında bulunmadığı belirtilmiş ve sonuçlar bu duruma göre tekrar hesaplandığında VITEK 2'nin izolatların %90'ını tür seviyesinde, %95,5'ini cins seviyesinde doğru olarak tanımladığı rapor edilmiştir.

Rennie ve ark. (2008) Amerika'da yaptıkları çok merkezli bir çalışmada 365 klinik izolatı, VITEK 2 (bioMérieux) ve 16S rRNA sekans analizi ile tiplendirmişlerdir. 16S rRNA sekans analizi sonucuna göre VITEK 2'nin 365 izolatın %95'ini doğru tanımladığı, %98,9'unu cins seviyesinde doğru tanımladığı, %1,1'ini ise tanımlayamadığı rapor edilmiştir.

Simmon ve ark. (2008) beş yıl süre zarfında Api 20A (bioMérieux) ve Sherlock (MIDI Inc) ticari biyokimyasal tanımlama sistemleri ile kan kültüründen izole edilen 316 anaerob izolatı 16S rRNA sekans analizi ile tiplendirerek sonuçları karşılaştırmışlardır. 16S rRNA sekans analizi ile 316 izolatın %91'ini tür seviyesinde, %100'ünü cins seviyesinde tanımladıklarını ve ticari biyokimyasal tanımlama sistemleri ile 316 izolatın %66'sını tür seviyesinde, %88'ini ise cins seviyesinde tanımladıklarını bildirmişlerdir.

Yunoki ve ark. (2016) Japonya'da bir üniversite hastanesinde çeşitli örneklerden izole edilen 170 anaerobik bakteriyi VITEK 2 (bioMérieux) ve MALDI-TOF MS (Microflex LT, Bruker Daltonik) kullanarak tiplendirmişler ve sonuçları 16S rRNA sekans analiz sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır. MALDI-TOF MS ile 170 izolatın %80'i tür seviyesinde, %85'i cins seviyesinde tanımlandığı, %14,7'sinin ise tanımlanamadığını

bildirmişlerdir. VITEK 2'nin 170 izolatin %58'ini tür seviyesinde, %71'ini cins seviyesinde doğru tanımladığı, %29,4'ünü ise tanımlayamadığı ya da yanlış tanımladığını rapor etmişlerdir.

Li ve ark. (2014) daha önce izole edilen 50 klinik izolatu ve 5 standart suşu, VITEK MS (bioMérieux) ve VITEK 2 (bioMérieux) tanımlama sistemleri ile tiplendirerek sonuçları 16S rRNA sekans analizine göre değerlendirmişlerdir. Her iki sistemin, referans suşları doğru olarak tanımladığını bildirmişlerdir. VITEK MS ile 50 izolatin %92'sini tür seviyesinde, %94'ünü cins seviyesinde tanımladıklarını, VITEK 2 ile ise %86'sını tür seviyesinde, %94'ünü cins seviyesinde doğru olarak tanımladıklarını bildirilmişlerdir.

Türkiye'de Perçin ve Ekincioğlu (2012) anaerob enfeksiyonların identifikasyonunda kültür altın standart alındığında multiplex PCR yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerini sırasıyla %100, %54, %28,4 ve %100 olarak bulmuşlardır. Gram boyama altın standart alındığında aynı değerleri sırasıyla %100, %84,2, %85,5 ve %100 olarak bulmuşlardır. Ayrıca multiplex PCR ile pozitif sonuçlarının konvansiyonel yöntemlere göre %6,7'den %54,4'e çıktığı gösterilmiştir. Tuzuner Oncul ve ark. (2015) multiplex PCR ile GPAK'ların doğrudan odontojenik örneklerden saptanması üzerine yaptıkları çalışmada, GPAK'ların klinik örneklerden direkt PCR ile %94,3 oranında, aynı örneklerin kültüründen yapılan PCR ile ise %66 oranında tespit edildiklerini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da moleküler yöntem olarak kullandığımız multiplex PCR tekniği, konvansiyonel ve ticari biyokimyasal tanımlama yöntemlerine göre çok daha fazla anaerob bakteriyi tanımlayabilmiştir. Çalışmamızda kültürlerden anaerob bakterilerin tanımlanma şansı konvansiyonel yöntemlere göre multiplex PCR ile %17,4'ten %43,5'e çıktığı görülmüştür. Çalışmada geliştirdiğimiz multiplex PCR panelinin etkinliğini tam olarak değerlendirmek için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda anaerob kültüründe üreme olan 8 örneğin 5'i (%62,5) multiplex PCR panelinin sonucu ile uyumlu çıkarken 3'ü (%37,5) uyumsuz çıkmıştır. Uyumsuz çıkan örneklerden 26 numaralı örnek *Propionibacterium acnes*, 7 numaralı örnek *Peptostreptococcus* spp. ve 36 numaralı örnek ise Gram pozitif kok olarak konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmıştır (Tablo 4.12). *Propionibacterium acnes*, multiplex PCR panelinde yer olmadığından bu yöntemle tanımlanamamıştır. Diğer iki örnekteki *Peptostreptococcus* spp. ve Gram pozitif kok için yaptığımız araştırma

sonucunda Api 20A'nın ve VITEK 2 tanımlama sistemlerinin GPAK'ları tam olarak tanımlayamadıklarını ve dolayısıyla 7 no'lu örnekteki bakterinin *Peptostreptococcus* spp. olma ihtimalinin düşük olduğunu, 36 no'lu örnekteki bakterinin ise *Peptostreptococcus* spp.'den farklı bir GPAK olma ihtimalinin yüksek olduğunu göstermektedir. GPAK'lar üzerine yaptığımız bu araştırmayı bazı yayınlar da desteklemektedir (Simmon ve ark., 2008; Nagy ve ark., 2012; Yunoki ve ark., 2016; Öncü, 2018).

Çalışmamızda referans suşlarla yapılan özgüllük çalışmalarında multiplex PCR panelinin özgüllüğünün, test panelinde yer alan her bir bakteri cinsi için yüksek olduğu bulunmuştur. Klinik örneklerle yapılan çalışmalarda konvansiyonel yöntemlerle elde edilen sonuçlar, multiplex PCR panelinin sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda anaerob kültür sonucunu referans yöntem olarak baz aldığımızda multiplex PCR panelinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %75, %63,2, %30 ve %92,3 bulunmuştur. Referans test olarak Gram boyama yöntemi baz alındığında ise multiplex PCR panelinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %100, %65, %30 ve %100 olarak bulunmuştur. Konvansiyonel yöntemlere göre hesaplanan tanısal değerler her ne kadar referans suşlarla yapılan özgüllük çalışmalarına göre düşük çıksa da çalışmamızda geliştirilen multiplex PCR panelinin konvansiyonel yöntemlere göre klinik örneklerden çok daha fazla anaerob bakteriyi çok daha kısa sürede saptadığı belirlenmiştir.

Klinik örneklerde enfeksiyon etkeni replike olmasa da ya da enfeksiyonun diğer kanıtlarını oluşturma da, moleküler yöntemlerin yüksek duyarlılıkları sayesinde örnekteki mikrobiyal DNA'nın çok düşük miktarları tespit edilebilir (Murray ve ark., 2016). PCR yöntemiyle bakterilerin minimum tespit limitini araştıran bazı çalışmalar incelendiğinde genellikle 10^1 - 10^2 CFU/ml bakterinin örneklerden tespit edilebildikleri görülmüştür. Portnoï ve ark. (2006) *Borrelia burgdorferi*'yi real-time PCR tekniği ile 10^1 /ml bakteri olarak örneklerden tespit edebildiklerini belirtmişlerdir. Wang ve ark. (2013) *E. coli* DNA'sını PicoGreen (Quant-iT) floresan metodu ile 0,781 ng/mL yoğunlukta, q-PCR metodu ile ise 1fg/mL yoğunlukta tespit edebildiklerini göstermişlerdir. Marín ve ark. (2012) *S. aureus* için 16S rRNA PCR yönteminin alt tespit sınırını 10^2 CFU/ml bulmuşlardır. De Gregorio ve ark. (2015) *Acinetobacter baumannii*'yi real-time PCR tekniğini kullanarak 20 CFU/ml olarak kan örneklerinden

tespit edebildiklerini göstermişlerdir. Chon ve ark. (2012) *C. perfringens*'i real-time PCR tekniği kullanarak 10^2 CFU/ml olarak gıda ürünleri içerisinde tespit edebildiklerini göstermişlerdir. Carloni ve ark. (2018) *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 ve *Listeria monocytogenes* türlerini hızlı ve eş zamanlı tespit etmek için geliştirdikleri multiplex real-time PCR metodu ile her bir patojeni 10^2 CFU/ml olarak aynı anda örneklerden tespit edebildiklerini göstermişlerdir. Sepsisli hastalarda en sık rastlanan patojenik bakterilerin multiplex PCR ile tanımlanmasına dayalı bir çalışmada patojenlerin tespit limiti, *E. faecalis* ve *S. aureus* için 10^2 CFU/ml, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, ve *E. coli* için ise 50 CFU/ml bulunduğu bildirilmiştir (Arabestani ve ark., 2014). Menenjit hastalarında BOS örneklerinin 16S rRNA PCR ile analiz edildiği bir çalışmada patojenlerin alt tespit sınırı *S. aureus* ve *E. coli* için 10^3 , *Campylobacter jejuni* için ise 10^2 CFU/ml olduğu bildirilmiştir (Xu ve ark., 2003).

Bizim çalışmamızda geliştirilen multiplex PCR panelinin minimum tespit değerleri Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre geliştirilen multiplex PCR panelinin, *Veillonella* spp. (1 CFU/ml), *Prevotella* spp. (10^1 CFU/ml), *Peptostreptococcus* spp. (10^1 CFU/ml), *Bacteroides* spp. (10^1 CFU/ml), *Fusobacterium* spp. (10^2 CFU/ml), *Actinomyces* spp. (10^2 CFU/ml), cinslerini tespit etme duyarlılığı diğer çalışmalara benzer bulunurken, *Clostridium* spp. (10^3 CFU/ml) cinsine duyarlılığı diğerlerine göre düşük bulunmuştur. Birçok primer seti kullanılarak yapılan multiplex PCR'ın, tekli PCR'a göre analitik duyarlılığında azalma olduğu (Song, 2005) göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda geliştirilen multiplex PCR panelinin bakterileri tespit etme duyarlılığı yukarıdaki çoğu tekli PCR çalışmalarıyla benzer değerlerde bulunmuştur.

Sonuç olarak, anaerobik bakterilerin önemli ölçüde morbidite ve mortalite ile ilişkili olan çeşitli ciddi enfeksiyonlarda önemli sıklıkta bulunmalarına rağmen, geleneksel mikrobiyolojik yöntemlerin yetersiz, karmaşık, pahalı ve zaman alıcı olması gibi nedenlerle klinik örneklerden yeterince saptanamadıkları görülmektedir. Anaerob kültürdeki başarıyı aynı zamanda örneklerin alındığı yer ve alınma şekli, laboratuvara taşınma şekli ve süresi gibi ön işlem basamakları da etkilemektedir ve bu işlem basamakları büyük ölçüde klinisyene bağlıdır. Bu yüzden anaerob kültürde başarılı bir sonuç için klinisyenle işbirliği içinde olunması ve laboratuvarda doğru ekipmanların kullanılması gerekmektedir.

Multiplex PCR, aynı reaksiyonda aynı anda birden fazla gen bölgesinin çoğaltıldığı değişken bir PCR yöntemidir. Laboratuvarda önemli miktarda zaman ve emek tasarrufu sağlama ve bakterileri daha doğru tanımlama potansiyeli vardır. Çalışmamızda geliştirilen multiplex PCR paneli, anaerob bakterilerin kültürde üremesine gerek kalmadan, klinik örneklerden direkt olarak hızlı tanısını sağlayan bir tanımlama kiti olmaya adaydır. Geliştirilmeye açık olan bu multiplex PCR paneli ile anaerobların kültüre dayalı tanımlanmalarındaki olumsuzluklar giderilerek, klinik örneklerden kısa sürede daha doğru anaerob bakteri tanımlaması yapılabileceği ve bu sayede antimikrobiyal duyarlılık testleri yapılmasa da enfeksiyonların tedavisinde klinisyenlere yardımcı olacağı kanaatindeyiz.

.

6. KAYNAKLAR

- Abed J, Maalouf N, Parhi L, Chaushu S, Mandelboim O, Bachrach G. Tumor targeting by *Fusobacterium nucleatum*: A pilot study and future perspectives. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017; 7: 295.
- Aksu B. Anaerop Enfeksiyonlarda Kullanılan Moleküler Yöntemler, In: KLİMUD-TMC Anaerop Enfeksiyonların Rutin Tanısı Kurs Kitabı, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 2011: 113-118.
- Aldridge KE, Ashcraft D, Cambre K, Pierson CL, Jenkins SG, Rosenblatt JE. Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001; 45: (4): 1238-1243.
- Arabestani MR, Fazzeli H, Nasr Esfahani B. Identification of the most common pathogenic bacteria in patients with suspected sepsis by multiplex PCR. *J Infect Dev Ctries*, 2014; 8: (4): 461-468.
- Aydın M. Anaerop Bakteriler ve Anaerobizim, In: Cengiz AT, Mısırlıgil A, Aydın M (eds.), *Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji*, Güneş Yayınevi, Ankara, 2004: 569-576.
- Barba MJ, Fernández A, Oviaño M, Fernández B, Velasco D, Bou G. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe*, 2014; 30: 126-128.
- Barreau M, Pagnier I, La Scola B. Improving the identification of anaerobes in the clinical microbiology laboratory through MALDI-TOF mass spectrometry. *Anaerobe*, 2013; 22: 123-125.

- Bartlett JG. Anaerobic Bacteria, In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds.), Infectious Diseases, 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004: 1768-1781.
- Bozkurt H, Güdücüoğlu H, Bayram Y, Gülmez S, Kutulay N, Bozkurt EN, Berktaş M. Klinik örneklerden izole edilen anaerob bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. Van Tıp Derg, 2004; 11: (3): 85-91.
- Brazier JS. *Veillonella* and Other Anaerobic Gram-Negative Cocci, In: Borriello SP, Murray PR, Funke G (eds.), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th edition, John Wiley and Sons, London, 2010: 1312-1316.
- Brook I. Recovery of anaerobic bacteria from clinical specimens in 12 years at two military hospitals. J Clin Microbiol, 1988; 26: (6): 1181-1188.
- Brook I. The Indigenous Microbial Flora in Children, In: Pediatric Anaerobic Infection: Diagnosis and Management, 3rd edition, Marcel Dekker, New York, 2002: 25-40.
- Brook I. Clinical Clues to Diagnosis of Anaerobic Infections, In: Anaerobic Infections Diagnosis and Management, Informa Healthcare, USA, 2008: 35-42.
- Brook I. Spectrum and treatment of anaerobic infections. J Infect Chemother, 2016; 22: (1): 1-13.
- Brook I. Anaerobic Bacteria, In: Cohen J, Powderly W, Opal SM (eds.), Infectious Diseases, 4th edition, Elsevier Limited, China, 2017: 1628-1644.
- Carlioni E, Rotundo L, Brandi G, Amagliani G. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes* by magnetic capture hybridization and multiplex real-time PCR. Folia Microbiol, 2018; 63: (6): 735-742.
- Carroll KC, Hobden JA. Infections Caused by Anaerobic Bacteria, In: Carroll KC, Morse SA, Mietzner T, Miller S (eds.), Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 27th edition, McGraw-Hill, New York, 2016: 293-299.

- Carroll KC, Patel R. Systems for Identification of Bacteria and Fungi, In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (eds.), Manual of Clinical Microbiology, 11th edition, ASM press, Canada, 2015: 29-43.
- Chon JW, Park JS, Hyeon JY, Park C, Song KY, Hong KW, Hwang IG, Kwak HS, Seo KH. Development of real-time PCR for the detection of *Clostridium perfringens* in meats and vegetables. J Microbiol Biotechnol, 2012; 22: (4): 530-534.
- Cobo F, Rodríguez-Granger J, Pérez-Zapata I, Sampedro A, Aliaga L, Navarro-Marí JM. Antimicrobial susceptibility and clinical findings of significant anaerobic bacteria in southern Spain. Anaerobe, 2019; 59: 49-53.
- Cohen-Poradosu R, Kasper DL. Anaerobic Infections: General Concepts, In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th edition, Elsevier Saunders, Canada, 2015: 2736-2743.
- Coltella L, Mancinelli L, Onori M, Lucignano B, Menichella D, Sorge R, Raponi M, Mancini R, Russo C. Advancement in the routine identification of anaerobic bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013; 32: (9): 1183-92.
- De Gregorio E, Roscetto E, Iula VD, Martinucci M, Zarrilli R, Di Nocera PP, Catania MR. Development of a real-time PCR assay for the rapid detection of *Acinetobacter baumannii* from whole blood samples. New Microbiol, 2015; 38: (2): 251-257.
- Doğan M, Baysal B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen anaerob bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. Mikrobiyol Bul, 2010; 44: 211-219.
- Doluca M. Gram Pozitif Sporlu Çomakların Geleneksel Yöntemlerle Tanımlanması, In: KLİMUD-TMC Anaerob Enfeksiyonların Rutin Tanısı Kurs Kitabı, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 2011: 37-44.
- Duerden BI. Virulence factors in anaerobes. Clin Infect Dis, 1994; 18: (Suppl 4): S253-S259.

- Durmaz B, Taştekin N. Anaerop enfeksiyon ön tanılı hastaların klinik örneklerinden izole edilen anaerobik bakteriler. *Mikrobiyol Bul*, 1997; 31: (1): 13-20.
- Emery CL, Appleman MD, Siders JA, Davis TE. Rapid Devices and Instruments for the Identification of Anaerobic Bacteria, In: Truant AL (ed.), *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*, 2nd edition, John Wiley & Sons, Canada, 2016: 56-86.
- Ercis S, Tunçkanat F, Haşcelik G. Anaerobik enfeksiyon şüpheli hastalardan izole edilen anaerop bakteriler. *Mikrobiyol Bul*, 2005; 39: 447-454.
- Fader RC. Anaerobes of Clinical Importance, In: Mahon CR, Lehman DC (eds.), *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th edition, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, 2019: 486-519.
- Fedorko DP, Drake SK, Stock F, Murray PR. Identification of clinical isolates of anaerobic bacteria using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012; 31: (9): 2257-62.
- Finegold SM. General Aspects of Anaerobic Infection, In: Finegold SM, George WL (eds.), *Anaerobic Infections in Humans*, Academic Press, USA, 1989: 137-154.
- Finegold SM. Changes in taxonomy, anaerobes associated with humans, 2001-2004. *Anaerobe*, 2004; 10: (6): 309-312.
- Funke G. *Actinomyces* and Related Genera, In: Borriello SP, Murray PR, Funke G (eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10th edition, John Wiley and Sons, London, 2010: 1005-1022.
- Garner O, Mochon A, Branda J, Burnham CA, Bythrow M, Ferraro M, Ginocchio C, Jennemann R, Manji R, Procop GW, Richter S, Rychert J, Sercia L, Westblade L, Lewinski M. Multi-centre evaluation of mass spectrometric identification of anaerobic bacteria using the VITEK(R) MS system. *Clin Microbiol Infect*, 2014; 20: (4): 335-339.

- Garrett WS, Onderdonk AB. *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, and *Fusobacterium* Species (and Other Medically Important Anaerobic Gram-Negative Bacilli), In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th edition, Elsevier Saunders, Canada, 2015: 2773-2780.
- Gerding DN, Young VB. *Clostridium difficile* Infection, In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th edition, Elsevier Saunders, Canada, 2015: 2744-2756.
- Gest H. Anaerobes in the Recycling of Elements in the Biosphere, In: Ljungdahl LG, Adams MW, Barton LL, Ferry JG, Johnson MK (eds.), Biochemistry and Physiology of Anaerobic Bacteria, Springer-Verlag, New York, 2003: 1-10.
- Glupczynski Y, Berhin C, Nizet H. Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in Belgium as determined by E-test methodology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009; 28: (3): 261-267.
- Gönüllü N. Molecular techniques for clinical diagnostic bacteriology. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72: (1): 63-72.
- Gürler N. Anaerob Kültür için Örneklerin Alınması Laboratuvara Nakli ve Laboratuvarda İşlenmesi, In: KLİMUD-TMC Anaerob Enfeksiyonların Rutin Tanısı Kurs Kitabı, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 2011: 16-27.
- Gürsoy NC, Otlı B. Mikrobiyota çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri. J Biotechnol and Strategic Health Res, 2017; 1: (Special issue): 56-67.
- Hall GS. Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight for the Identification of Anaerobic Bacteria, In: Leber AL (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th edition, ASM Press, USA, 2016: 4.10.1-4.10.5.
- Hall GS, Byrd L. Examination of Primary Culture Plates for Anaerobic Bacteria, In: Leber AL (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th edition, ASM Press, USA, 2016: 4.5.1-4.5.6.

- Hall GS, Holden J. Collection, Transport, and Processing of Clinical Specimens for Anaerobic Culture, In: Leber AL (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th edition, ASM Press, USA, 2016: 4.2.1-4.2.8.
- Hall GS, Mangels JI. Commercial Kit Overnight Biochemical Systems for the Identification of Anaerobes, In: Leber AL (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th edition, ASM Press, USA, 2016a: 4.7.1-4.7.3.
- Hall GS, Mangels JI. Culture Media for Anaerobes, In: Leber AL (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th edition, ASM Press, USA, 2016b: 4.3.1-4.3.10.
- Hall GS, Mangels JI. Incubation Techniques for Anaerobic Bacteriology Specimens, In: Leber AL (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th edition, ASM Press, USA, 2016c: 4.4.1-4.4.4.
- Hall GS, Mangels JI. Rapid Enzymatic Systems for the Identification of Anaerobes, In: Leber AL (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th edition, ASM Press, USA, 2016d: 4.8.1-4.8.5.
- Hall GS, Summanen P. Rapid Disk, Spot Tests, and Other Rapid or Primary Methods for the Identification of Anaerobes, In: Leber AL (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th edition, ASM Press, USA, 2016: 4.6.1.1-4.6.13.5.
- Hall W, Copsey SD. *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and Other Non-Spore-Forming Anaerobic Gram-Positive Rods, In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (eds.), Manual of Clinical Microbiology, 11th edition, ASM press, Canada, 2015: 920-939.
- Handal N, Bakken Jørgensen S, Smith Tunsjø H, Johnsen BO, Leegaard TM. Anaerobic blood culture isolates in a Norwegian university hospital: identification by MALDI-TOF MS vs 16S rRNA sequencing and antimicrobial susceptibility profiles. APMIS, 2015; 123: (9): 749-758.
- Hentges DJ. The anaerobic microflora of the human body. Clin Infect Dis, 1993; 16: (Suppl 4): S175-S180.

Hodowanec A, Bleck TP. Botulism (*Clostridium botulinum*), In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th edition, Elsevier Saunders, Canada, 2015a: 2763-2767.

Hodowanec A, Bleck TP. Tetanus (*Clostridium tetani*), In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th edition, Elsevier Saunders, Canada, 2015b: 2757-2762.

<https://apiweb.biomerieux.com>, Erişim tarihi: 23.02.2019.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, Erişim tarihi: 10.07.2018.

Jamal W, Shahin M, Rotimi VO. Surveillance and trends of antimicrobial resistance among clinical isolates of anaerobes in Kuwait hospitals from 2002 to 2007. *Anaerobe*, 2010; 16: (1): 1-5.

Jeverica S, Kolenc U, Mueller-Premru M, Papst L. Evaluation of the routine antimicrobial susceptibility testing results of clinically significant anaerobic bacteria in a Slovenian tertiary-care hospital in 2015. *Anaerobe*, 2017; 47: 64-69.

Kierzkowska M, Majewska A, Sawicka-Grzelak A, Mlynarczyk A, Chmura A, Durluk M, Deborska-Materkowska D, Paczek L, Mlynarczyk G. Specific character of anaerobic bacterial infections in patients treated in transplantation wards at one of the clinical hospitals in Warsaw. *Transplant Proc*, 2014; 46: (8): 2586-2588.

Kiremitçi A, Argun Türkkan A, Akgün Y, Durmaz G, Kaşıfoğlu N. Klinik örneklerden anaerob bakterilerin soyutlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Ankem Derg*, 2008; 22: (3): 132-144.

Kıyan M. Anaerob Bakteriler, In: Ustaçelebi Ş (ed.), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Günes Kitabevi, Ankara, 1999: 611-22.

Kıyan M. *Clostridium* Türleri, In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds.), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3. baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008: 2350-2362.

- Koru O, Ozyurt M. Determination of antimicrobial susceptibilities of clinically isolated anaerobic bacteria by E-test, ATB-ANA and agar dilution. *Anaerobe*, 2008; 14: (3): 161-165.
- KÖnÖnen E. Anaerobic Cocci and Anaerobic Gram-Positive Nonsporulating Bacilli, In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th edition, Elsevier Saunders, Canada, 2015: 2781-2786.
- KÖnÖnen E, Conrads G, Nagy E. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and Other Anaerobic Gram-Negative Rods, In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 11th edition, ASM press, Canada, 2015: 967-993.
- Kurtz DM. Oxygen and Anaerobes, In: Ljungdahl LG, Adams MW, Barton LL, Ferry JG, Johnson MK (eds.), *Biochemistry and Physiology of Anaerobic Bacteria*, Springer-Verlag, New York, 2003: 128-142.
- Külekçi G, Topcuoğlu N. Anaerobik Bakterilerin Genel Özellikleri ve Normal Floradaki Yerleri, In: KLİMUD-TMC Anaerobik Enfeksiyonların Rutin Tanısı Kurs Kitabı, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 2011: 5-15.
- Lassmann B, Gustafson DR, Wood CM, Rosenblatt JE. Reemergence of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis*, 2007; 44: (7): 895-900.
- Lee EH, Degener JE, Welling GW, Veloo AC. Evaluation of the Vitek 2 ANC card for identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol*, 2011; 49: (5): 1745-1749.
- Lee W, Kim M, Yong D, Jeong SH, Lee K, Chong Y. Evaluation of VITEK mass spectrometry (MS), a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS system for identification of anaerobic bacteria. *Ann Lab Med*, 2015; 35: (1): 69-75.
- Li L, Michel R, Cohen J, Decarlo A, Kozarov E. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol*, 2008; 8: 26.

- Li Y, Gu B, Liu G, Xia W, Fan K, Mei Y, Huang P, Pan S. MALDI-TOF MS versus VITEK 2 ANC card for identification of anaerobic bacteria. *J Thorac Dis*, 2014; 6: (5): 517-523.
- Marchand-Austin A, Rawte P, Toye B, Jamieson FB, Farrell DJ, Patel SN. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of anaerobic bacteria in Ontario, 2010-2011. *Anaerobe*, 2014; 28: 120-125.
- Marín M, Garcia-Lechuz JM, Alonso P, Villanueva M, Alcalá L, Gimeno M, Cercenado E, Sánchez-Somolinos M, Radice C, Bouza E. Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol*, 2012; 50: (3): 583-589.
- Matsuki T. Development of quantitative PCR detection method with 16S rRNA gene-targeted genus-and species-specific primers for the analysis of human intestinal microflora and its application. *Nihon Saikingaku Zasshi*, 2007; 62: (2): 255-261.
- Murphy EC, Frick IM. Gram-positive anaerobic cocci—commensals and opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, 2013; 37: (4): 520-553.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Molecular Diagnosis, In: *Medical Microbiology*, 8th edition, Elsevier Inc., Canada, 2016: 22-25.
- Nagy E, Becker S, Kostrzewa M, Barta N, Urbán E. The value of MALDI-TOF MS for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in routine laboratories. *J Med Microbiol*, 2012; 61: (10): 1393-1400.
- Namıkoğlu L. Anaerobik enfeksiyonların patogenezi ve tedavisindeki yeni gelişmeler. *Mikrobiyol Bul*, 1990; 24: 386-395.
- Ng LS, Kwang LL, Yeow SC, Tan TY. Anaerobic culture of diabetic foot infections: organisms and antimicrobial susceptibilities. *Ann Acad Med Singapore*, 2008; 37: (11): 936-939.
- Ngo JT, Parkins MD, Gregson DB, Pitout JD, Ross T, Church DL, Laupland KB. Population-based assessment of the incidence, risk factors, and outcomes of anaerobic bloodstream infections. *Infection*, 2013; 41: (1): 41-48.

- Nolte FS. Molecular Microbiology, In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (eds.), Manual of Clinical Microbiology, 11th edition, ASM press, Canada, 2015: 54-90.
- Onderdonk AB, Garrett WS. Gas Gangrene and Other *Clostridium*-Associated Diseases, In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th edition, Elsevier Saunders, Canada, 2015: 2768-2772.
- Öncü A. Gram pozitif anaerob kokların antibiyotiklere duyarlılıklarının fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2018: 54-74.
- Parikh R, Mathai A, Parikh S, Chandra Sekhar G, Thomas R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. Indian J Ophthalmol, 2008; 56: (1): 45-50.
- Perçin D, Ekincioglu P. Anaerob enfeksiyonların tanısında multiplex PCR yönteminin değerlendirilmesi, 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 3-7 Kasım 2012, Kuşadası, Aydın, 318.
- Portnoï D, Sertour N, Ferquel E, Garnier M, Baranton G, Postic D. A single-run, real-time PCR for detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, based on the hbb gene sequence. FEMS Microbiol Lett, 2006; 259: (1): 35-40.
- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, W. KE, Schreckenberger PC, Woods GL. The Anaerobic Bacteria, In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 7th edition, Wolters Kluwer, China, 2017: 983-1073.
- Rainey FA. Family X. Veillonellaceae Rogosa 1971b, 232^{AL}, In: Vos PD, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, Springer, New York, 2009: 1059-1129.

- Rennie RP, Brosnikoff C, Turnbull L, Reller LB, Mirrett S, Janda W, Ristow K, Krilcich A. Multicenter evaluation of the Vitek 2 anaerobe and *Corynebacterium* identification card. *J Clin Microbiol*, 2008; 46: (8): 2646-2651.
- Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol*, 2004; 97: (6): 1166-1177.
- Roberts SA, Shore KP, Paviour SD, Holland D, Morris AJ. Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in New Zealand: 1999-2003. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 57: (5): 992-998.
- Rodríguez-Cavallini E, Vargas P, Rodríguez C, Quesada-Gómez C, Gamboa-Coronado MM. Phenotypic identification of over 1000 isolates of anaerobic bacteria recovered between 1999 and 2008 in a major Costa Rican hospital. *Clin Microbiol Infect*, 2011; 17: (7): 1043-1047.
- Rodríguez-Sánchez B, Alcalá L, Marin M, Ruiz A, Alonso E, Bouza E. Evaluation of MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) for routine identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe*, 2016; 42: 101-107.
- Rolfe RD, Hentges DJ, Campbell BJ, Barrett JT. Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1978; 36: (2): 306-313.
- Shah HN, Gharbia SE, Olsen I. *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas*, In: Borriello SP, Murray PR, Funke G (eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10th edition, John Wiley and Sons, London, 2010: 1913-1944.
- 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: 132-136.

- Shenoy PA, Vishwanath S, Gawda A, Shetty S, Anegundi R, Varma M, Mukhopadhyay C, Chawla K. Anaerobic bacteria in clinical specimens - Frequent, but a neglected lot: A five year experience at a tertiary care hospital. *J Clin Diagn Res*, 2017; 11: (7): DC44-DC48.
- Shore KP, Pottumarthu S, Morris AJ. Susceptibility of anaerobic bacteria in Auckland: 1991-1996. *N Z Med J*, 1999; 112: (1099): 424-426.
- Simmon KE, Mirrett S, Reller LB, Petti CA. Genotypic diversity of anaerobic isolates from bloodstream infections. *J Clin Microbiol*, 2008; 46: (5): 1596-1601.
- Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Hecht DW, Goldstein EJ, Harrell L, Jenkins S, Newton D, Pierson C, Rihs JD, Yu VL, Venezia R, Finegold SM, Rosenblatt JE, Gorbach SL. Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005–2007). *Clin Infect Dis*, 2010; 50: (Suppl 1): S26-S33.
- Song Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe*, 2005; 11: (1-2): 79-91.
- Song Y, Finegold SM. *Peptostreptococcus*, *Finegoldia*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Veillonella*, and Other Anaerobic Cocci, In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 11th edition, ASM press, Canada, 2015: 909-919.
- Staley JT, Whitman WB. Phylum XIX. Fusobacteria Garrity and Holt 2001, 140, In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, Springer, New York, 2010: 747-774.
- Stevens DL, Bryant AE, Carroll K. *Clostridium*, In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 11th edition, ASM press, Canada, 2015: 940-966.
- Şengöz G, Yaşar K, Berzeg D, Yıldırım F, Şengöz A, Elmi Ş, Durdu Y, Nazlıcan Ö. Klinik örneklerden izole edilen anaerob bakteriler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2005; 35: 107-113.

- Tan TY, Ng LS, Kwang LL, Rao S, Eng LC. Clinical characteristics and antimicrobial susceptibilities of anaerobic bacteremia in an acute care hospital. *Anaerobe*, 2017; 43: 69-74.
- Tang P, Foubister V, Pucciarelli MG, Finlay BB. Methods to study bacterial invasion. *J Microbiol Methods*, 1993; 18: (3): 227-240.
- Tille PM. Anaerobic Bacteriology, In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 14th edition, Elsevier, China, 2017: 499-523.
- Tunçkanat F. Anaerop Bakterilerin Genel Özellikleri, In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds.), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3. baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008a: 2319-2333.
- Tunçkanat F. Anaerop Gram Negatif Basiller, In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds.), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3. baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008b: 2339-2344.
- Tuzuner Oncul AM, Uzunoglu E, Karahan ZC, Aksoy AM, Kisinisci R, Karaahmetoglu O. Detecting Gram-positive anaerobic cocci directly from the clinical samples by multiplex polymerase chain reaction in odontogenic infections. *J Oral Maxillofac Surg*, 2015; 73: (2): 259-266.
- Uysal EB, Çelik C, Alan Ç, Kaya H, Gözel MG, Bakıcı MZ. Klinik örneklerden izole edilen anaerobik bakteriler: Yedi yıllık değerlendirme. *Cumhuriyet Med J*, 2014; 36: (3): 327-331.
- Ülger N. Gram Pozitif Koklar ve Sporsuz Çomaklar, In: KLİMUD-TMC Anaerop Enfeksiyonların Rutin Tanısı Kurs Kitabı, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 2011: 45-52.
- Veloo AC, van Winkelhoff AJ. Antibiotic susceptibility profiles of anaerobic pathogens in The Netherlands. *Anaerobe*, 2015; 31: 19-24.
- Veloo AC, Welling GW, Degener JE. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. *Anaerobe*, 2011; 17: (4): 211-212.
- Veloo ACM, Jean-Pierre H, Justesen US, Morris T, Urban E, Wybo I, Kostrzewa M, Friedrich AW. Validation of MALDI-TOF MS Biotyper database optimized for anaerobic bacteria: The ENRIA project. *Anaerobe*, 2018; 54: 224-230.

- Vena A, Muñoz P, Alcalá L, Fernandez-Cruz A, Sanchez C, Valerio M, Bouza E. Are incidence and epidemiology of anaerobic bacteremia really changing? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015; 34: (8): 1621-1629.
- Wang L, Rao C, Gao K, Li Y, Fu Z, Bi H, Wang J. Development of a reference standard of *Escherichia coli* DNA for residual DNA determination in China. *PLoS One*, 2013; 8: (9): e74166.
- Willis AT. History, In: Finegold SM, George WL (eds.), *Anaerobic Infections in Humans*, Academic Press Inc, USA, 1989: 1-22.
- Wren MWD. Gram-Positive Anaerobic Cocci, In: Borriello SP, Murray PR, Funke G (eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10th edition, John Wiley and Sons, London, 2010: 903-921.
- Wybo I, Van den Bossche D, Soetens O, Vekens E, Vandoorslaer K, Claeys G, Glupczynski Y, Ieven M, Melin P, Nonhoff C, Rodriguez-Villalobos H, Verhaegen J, Pierard D. Fourth Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 2014; 69: (1): 155-161.
- Xiao Z, Luo Y, Ye L, Wang R, Zhang Y, Zhao Q, Guo L, Ma Y, Cui S. Evaluation of VITEK matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of anaerobes. *Microbiol Immunol*, 2016; 60: (7): 477-482.
- Xu J, Millar BC, Moore JE, Murphy K, Webb H, Fox AJ, Cafferkey M, Crowe MJ. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis--rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. *J Appl Microbiol*, 2003; 94: (2): 197-206.
- Xu M, Yamada M, Li M, Liu H, Chen SG, Han YW. FadA from *Fusobacterium nucleatum* utilizes both secreted and nonsecreted forms for functional oligomerization for attachment and invasion of host cells. *J Biol Chem*, 2007; 282: (34): 25000-25009.

Yilmaz O, Verbeke P, Lamont RJ, Ojcius DM. Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 2006; 74: (1): 703-710.

Yunoki T, Matsumura Y, Nakano S, Kato K, Hotta G, Noguchi T, Yamamoto M, Nagao M, Takakura S, Ichiyama S. Genetic, phenotypic and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry-based identification of anaerobic bacteria and determination of their antimicrobial susceptibility at a University Hospital in Japan. *J Infect Chemother*, 2016; 22: (5): 303-307.

Yunoki T, Matsumura Y, Yamamoto M, Tanaka M, Hamano K, Nakano S, Noguchi T, Nagao M, Ichiyama S. Genetic identification and antimicrobial susceptibility of clinically isolated anaerobic bacteria: A prospective multicenter surveillance study in Japan. *Anaerobe*, 2017; 48: 215-223.

Zaleznik DF, Kasper DL. Role of Bacterial Virulence Factors in Pathogenesis of Anaerobic Infections, In: Finegold SM, George WL (eds.), *Anaerobic Infections in Humans*, Academic Press Inc, USA, 1989: 81-95.

EKLER

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011- KAİK-BD)				
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Klinik örneklerde anaerop enfeksiyon etkenlerinin tanımlanması için multiplex PCR paneli geliştirilmesi		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ		
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11		
	FAKS	0 352 437 52 55		
	E-POSTA	byancar@erciyes.edu.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Duygu Perçin		
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Mikrobiyoloji		
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri		
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ ADI SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
		FAZ 3	☐	
FAZ 4		☐		
Gözlemsel ilaç çalışması		☐		
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐		
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐		
İlaç dışı klinik araştırma		☒		
Diğer ise belirtiniz	Doktora Tezi			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ ☐	ÇOKMERKEZ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

ASLI GİRİDİR



1923

Funda HAŞCIZMECİ
Etik Kurul Sekreteri

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Klinik örneklerde anaerob enfeksiyon etkenlerinin tanımlanması için multiplex PCR paneli geliştirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Version Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama					
	SIGORTA	☐					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐					
	İLAN	☐					
	YILLIK BİLDİRİM	☐					
	SONUÇ RAPORU	☐					
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2017/316	Tarih : 02.06.2017	Funda HAZİZMECİ Etik Kurul Sekreteri				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyl Klinik Uygulamaları Klavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile İlişki	Katılım (*)	İmza
Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Halk Sağlığı	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ	Çocuk Sağ. ve Hast.l	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Aydın ÜNAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü.Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Kemal ÖZYURT	Dermatoloji	Kayseri Eğitim Hast.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağır, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek. Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Cihangir BİÇER	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yard. Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yard. Doç. Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Av. Serhat ÜSTÜNEL	Avukat	Hukuk Müşaviri	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Sevrap Koçer	Sivil Üye	Serbest	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmamalıdır

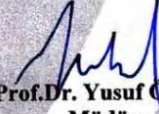
Sayı: 68742022- 903.01.02-121
Konu: Değerlendirme Onay

27/09/2017

Sayın; Prof. Dr. Duygu PERÇİN

“Klinik Örneklerde Anaerob Enfeksiyon Etkenlerinin Tanımlanması için Multiplex PCR Paneli Geliştirilmesi” başlıklı projenizi merkezimizde gerçekleştirilmesi tarafımızca uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.


Prof.Dr. Yusuf ÖZKUL
Müdür

KLİNİK ÖRNEKLERDE ANAEROB ENFEKSİYON ETKENLERİNİN TANIMLANMASI İÇİN MULTİPLEX PCR PANELİ GELİŞTİRİLMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%6

BENZERLİK ENDEKSİ

%4

İNTERNET
KAYNAKLARI

%4

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.mikrobiyolbul.org

İnternet Kaynağı

%1

2

rd.springer.com

İnternet Kaynağı

%1

3

biotechealthresearch.com

İnternet Kaynağı

<%1

4

doctiktak.com

İnternet Kaynağı

<%1

5

S FINEGOLD. "Anaerobic InfectionsA Clinical Overview", Molecular Medical Microbiology, 2002

Yayın

<%1

6

Iossif A. Strehin. "Characterizing ECM Production by Cells Encapsulated in Hydrogels", Methods in Molecular Biology, 2009

Yayın

<%1

www.nzimls.org.nz

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad soyadı : Mehmet ÖLÇÜ
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum tarihi ve yeri :10.09.1981 – Kayseri
Medeni Hali : Evli
Email : mehmetolcu@gmail.com
Yazışma Adresi : Gültepe Mah. Gelincik Sok. Okut Ap. No: 4/6
Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Üniversite/Enstitü-Fakülte/Alan	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Erciyes Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.	Devam ediyor
Yüksek lisans	Erciyes Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.	2007
Lisans	Erciyes Üniversitesi / Fen-Edebiyat Fakültesi / Biyoloji A.D.	2003
Lise	Kayseri Aydınlikevler Lisesi	1998

YABANCI DİL

İngilizce

Katıldığı Kurslar Sınavlar

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
Bilgisayar Kullanım Sertifikası