

Agarda Dilüsyon ve Deneme Aşamasındaki EUCAST Disk Difüzyon Yöntemi ile Saptanan *Bacteroides fragilis* Grubu İzolatlarına Ait Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması

Comparison of the Antimicrobial Susceptibility Results of *Bacteroides fragilis* Group Isolates Determined by Agar Dilution and the Tentative EUCAST Disk Diffusion Method

Semra Eminoğlu*[©], Bermal Tekeş*[©], Elvan Sayın**[©], Nurver Ülger Toprak*[©]

*Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

Atf/Cite as: Eminoğlu S, Tekeş B, Sayın E, Ülger Toprak N. Agarda dilüsyon ve deneme aşamasındaki EUCAST disk difüzyon yöntemi ile saptanan *Bacteroides fragilis* grubu izolatlarına ait antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):109-18.

Öz

Amaç: Bu çalışmada, yakın zamanda European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından anaeroplara için geliştirilen disk difüzyon testi ve Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI) tarafından anaerop bakteriler için önerilen standart, agarda dilüsyon yöntemleriyle enfeksiyon etkeni *Bacteroides fragilis* grubu (BFG) bakterilerinin antimikrobiyallere duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır, iki testin sonuçları arasında uyumluluk araştırılmıştır.

Yöntem: Hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında, Ocak 2017 ile Aralık 2018 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve MALDI-TOF MS ile tanımlanan 56 BFG izolatlarının ampisilin/sulbaktam, sefoksitin, imipenem, klindamisin, tigesiklin, moksifloksasin ve metronidazole duyarlılıkları koyun kanıyla zenginleştirilmiş Brucella agar kullanılarak agarda dilüsyon yöntemiyle, at kanı ile zenginleştirilmiş Fastidious Anaerobic Agar (FAA) besiyeri kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir.

Bulgular: Batın içi absesi (n=24), kan (n=10) ve doku biyopsi örneği (n=11) gibi çeşitli klinik materyallerden izole edilen, çoğunluğu *Bacteroides fragilis* (n=34, %61) ve *Bacteroides thetaioaomicron* (n=11, %20) izolatlarından oluşan altı BFG türü tanımlanmıştır. Agarda dilüsyon yöntem sonuçlarına göre izolatlar üzerine en etkili antimikrobiyaller %98.2 duyarlılık oranlarıyla imipenem ve metronidazol olmuş, bunu sırasıyla %89.3 ve %66.1 oranlarıyla tigesiklin ve ampisilin/sulbaktam izlemiştir. Moksifloksasine duyarlı olanların oranı %57.1, klindamisine ise %46.4 bulunmuştur. İki yöntemin, izolatların antimikrobiyallere duyarlılık durumlarını belirleme performansları metronidazol için %100, imipenem ve tigesiklin için %89.8 uyumlu bulunmuştur. Diğer antibiyotikler için kabul edilebilir uyum saptanmamıştır.

Sonuç: BFG bakterilerinin metronidazol, imipenem ve tigesikline duyarlılıklarını belirlemede disk difüzyon yönteminin; klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolaylıkla uygulanabilir, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu söyleyebiliriz. Ancak, bir standardın oluşturulması adına, özellikle diğer antimikrobiyaller için daha fazla izolatın ele alındığı, deney koşullarının optimize edildiği çalışmaların gerektiğini düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: *Bacteroides fragilis* grubu bakteriler, agarda dilüsyon, disk difüzyon

ABSTRACT

Objective: In this study it was aimed to determine the antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group (BFG) bacteria using recently developed European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) disc diffusion method and agar dilution method recommended by Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI) for anaerobes and to investigate the agreement of the results of two tests.

Method: The antimicrobial susceptibilities of a total of 56 BFG strains isolated from clinical samples and identified by MALDI-TOF MS analysis between January 2017 and December 2018, were tested to ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefoxitin, imipenem, clindamycin, tigecycline, moxifloxacin and metronidazole MICs were determined by agar dilution method using sheep blood supplemented Brucella agar and disk diffusion test using host blood supplemented Fastidious Anaerobic Agar (FAA).

Results: Six different BFG species consisting mostly strains of *Bacteroides fragilis* (n=34, 61%) and *Bacteroides thetaioaomicron* (n=11, 20%) isolated from various clinical samples such as intraabdominal abscess (n= 24), blood (n=10) and tissue biopsy samples (n=11).were identified. Imipenem and metronidazole were the most effective antimicrobials with 98.2% susceptibility rates, followed by tigecycline, ampicillin/sulbactam, moxifloxacin and clindamycin with susceptibility rates of 89.3%, 66.1%, 57.1% and 46.4%, respectively. Most concordant results were obtained with metronidazole (100%), imipenem (89.8%) and tigecycline (89.8%). Acceptable compliance rates were not found for other antimicrobials.

Conclusion: We can say that disc diffusion method is a fast, easy-to-apply, and reliable method used in clinical microbiology laboratories to determine the susceptibility of BFG bacteria to metronidazole, imipenem and tigecycline. However, to evolve a standard method especially for other antimicrobials, the experimental conditions should be optimized with studies done with greater number of isolates.

Keywords: *Bacteroides fragilis* group bacteria, agar dilution method, disc diffusion method

Alındığı tarih / Received:

15.09.2020 / 15.September.2020

Kabul tarihi / Accepted:

10.11.2020 / 10.November.2020

Yayın tarihi / Publication date:

01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

S. Eminoğlu 0000-0002-2541-2496

B. Tekeş 0000-0003-4511-4709

E. Sayın 0000-0002-1320-1704

N. Ülger Toprak 0000-0002-9766-5978

✉ nulger@marmara.edu.tr

GİRİŞ

Bacteroides fragilis grubu (BFG) bakteriler zorunlu anaerop gram negatif çomaklardır. Kolon mikrobiyotasının önemli kısmını oluştururlar. Cerrahi girişim veya travmaya bağlı bağırsak mukoza bütünlüğünün bozulduğu, bağışık yanıtın baskılandığı durumlarda vücudun diğer bölgelerine yayılarak ciddi seyirli, hatta ölümlü sonlanan fırsatçı enfeksiyonlara neden olabirler⁽¹⁾. BFG bakteriler, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides nordii*, *Bacteroides vulgatus* ve *Bacteroides thetaiotaomicron* gibi *Bacteroides* türlerinden ve *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides goldsteinii* ve *Parabacteroides merdae* gibi *Parabacteroides* türlerinden [<https://lpsn.dsmz.de/genus/bacteroides>] oluşur. Türler arasında birtakım farklılıklar bulunmakla beraber, BFG bakteriler yüksek virülans özelliklere sahiptirler ve anaerop bakteriler arasında enfeksiyonlara en fazla yol açan organizmalardır. Bu bakteriler aynı zamanda diğer anaerop bakterilere göre antibiyotiklere daha fazla dirençlidirler⁽¹⁾.

BFG bakterileri vankomisin, kanamisin, kolistin, aztreonam, aminoglikozitler ve trimetoprim- sülfametoksazol antibiyotiklerine doğal dirençlidirler⁽²⁾. İzolatların çoğu penisilinlere, tetrasiklinlere yüksek oranda direnç kazanmışlardır. Bunun yanı sıra klindamisin, moksifloksasin gibi anaerop enfeksiyonların tedavisinde kullanılan birçok antibiyotiğe artan oranda direnç geliştirdikleri saptanmıştır. BFG bakterileri üzerine etkili olabilecek β -laktam/ β -laktamaz inhibitörleri, karbapenemler, tigesiklin, kloramfenikol ve metronidazol gibi az sayıda antibiyotik vardır⁽³⁻⁶⁾. Ancak, son yıllarda BFG bakterilerinin bu antibiyotiklere de direnç geliştirdikleri, aynı zamanda çok antibiyotiğe direnç sergiledikleri ve yüksek oranda mortaliteye yol açtıkları bildirilmiştir^(7,8).

Gerek ülkemizde gerekse dünya genelinde mikrobiyoloji laboratuvarlarının çoğunda anaeroplara, dolayısıyla BFG bakterilerinin kültürleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları rutin olarak çalışılmaz⁽²⁾. Bunun önemli nedenlerinden birisi, anaerop bakterilerin duyarlılıklarını belirlemek için önerilen agarda dilüsyon testinin, rutin mikrobiyoloji laboratuvarında uygulanabi-

lecek pratik bir yöntem olmamasıdır⁽⁹⁾. Günümüzde güvenilir, hızlı, laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir yöntem geliştirme arayışları vardır. Çalışmalardan birisi European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)'in geliştirmekte olduğu disk difüzyon yöntemiyle BFG bakterilerinde duyarlılık testidir⁽¹⁰⁾. Çalışmanın sonuçları BFG bakterilerde, belirli antibiyotikler için disk difüzyon testinin günlük laboratuvar uygulamalarında güvenle kullanılabileceğini göstermiştir. Bir standart oluşturmak ve bir rehber hazırlamak adına optimizasyon çalışmaları sürdürülmektedir.

Bu çalışmada, laboratuvarımızda, klinik materyallerden izole edilmiş BFG bakterilerinin EUCAST'ın geliştirmekte olduğu disk difüzyon yöntemi ve anaerop bakteriler için önerilen standart, agarda dilüsyon yöntemi ile duyarlılıklarının belirlenmesi, elde edilen sonuçlara göre disk difüzyon yönteminin laboratuvarımızda rutinde uygulanabilirliği araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatların belirlenmesi: Çalışmamıza, Ocak 2017 ile Aralık 2018 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi, Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen, enfeksiyon etkeni BFG bakterileri dâhil edilmiştir. Klinik örnekler genel cerrahi (n=17), iç hastalıkları (n=9), kadın hastalıkları (n=6), yoğun bakım servisleri (n= 5), acil servis (n=5), enfeksiyon hastalıkları (n=4) ve diğer kliniklerden gönderilmiştir. Örnekler 53 hastadan alınmış, çoğu batın içinden olmak üzere apselerden (n=26), dokudan biyopsi örneklerinden (n=10), kan (n=10) ve diğer vücut sıvılarından oluşmuştur. Birer plevra, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve dokudan biyopsi örneklerinden ikişer farklı BFG türü olmak üzere üretilen toplam 56 BFG izolatı çalışmaya alınmış, yineleyen üremelerden birisi çalışmaya dâhil edilmiştir. Tanımlanan izolatlar -80°C'de saklanmıştır. Duyarlılık testi yapılabildiği zaman, bakterilerin canlandırılması için zenginleştirilmiş Brucella agarda (%5 koyun kanı, K vitamin; 1 µg/ml ve hemin; 5 µg/ml bulduran) üç kez ardışık olarak anaerop ortamda (Bactron-I, SHELLAB, ABD) kültürleri yapılmıştır.

İzolatların tanımlanması: Aerotolerans testiyle sadece anaerop ortamda üreyebilen, Gram negatif boyanma özelliğine sahip, identifikasyon amaçlı kullanılan kolistin (10 µg), vankomisin (5 µg) ve kanamisin (1000 µg) disklerine dirençli, safralı besiyerinde üreyebilen, hareketsiz, katalaz aktivitesi gösteren basiller BFG bakterileri olarak değerlendirilmiştir⁽¹¹⁾. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması MALDI-TOF MS ile yapılmıştır. Sistemin kullanım kılavuzu önerilerine uygun olarak birer koloniden hazırlanan preparatlar lazer atışlarına maruz bırakılmış ve elde edilen kütle spektromları VITEK® MS'in (bioMérieux, Fransa) V3.0 bilgi veri tabanındaki spektrumlarla karşılaştırılarak bakteri tanımlanmıştır. Sistemin kalibrasyonu ve bakterilerin tanımlanma kontrolü ATCC *Escherichia coli* 8739 izolatı ile yapılmıştır.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri: Çalışmamızda kullanılan antibiyotikler; Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI) ve EUCAST önerileri dikkate alınarak seçilmiştir^(12,13). İzolatların ampicilin, ampicilin/sulbaktam, sefoksitin, imipenem, tigesiklin, klindamisin, moksifloksasin ve metronidazole (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, ABD) duyarlılık durumları agarda dilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle belirlenmiştir^(10,12). Kontrol olarak ATCC 25285 *Bacteroides fragilis* izolatı kullanılmıştır.

Agarda dilüsyon yöntemi: Agarda dilüsyon yönteminde CLSI (M11-A7) önerilerine uygun şekilde, antibiyotiklerin yarı yarıya sulandırılmalarıyla hazırlanmış, hemin, K vitamini ve %5 koyun kanı bulunduran Brucella agar kullanılmıştır⁽¹²⁾. K vitamini ve heminle zenginleştirilmiş Brucella sıvı besiyerlerinde bir gecelik inkübasyonla elde edilmiş bakteri kültürü 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde ayarlanmış, 1/10 oranında sulandırılmıştır. Bakteri süspansiyonundan 10'ar µl önceden hazırlanmış antibiyotikli besiyerlerine damlatılarak inoküle edilmiştir. Her bir plakta 25 izolat bulunacak şekilde inokülasyon işlemleri tamamlandıktan sonra plaklar 37°C'de 48 saat anaerop ortamda (Bactron-I, SHELLAB, ABD) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üremenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir⁽¹²⁾. İzolatların antibiyotiklere duyarlılık durumu EUCAST klinik sınır değerlerine göre

yorumlanmıştır⁽¹³⁾. EUCAST klinik sınır değeri bulunmayan antibiyotikler için CLSI sınır değerleri kullanılmıştır. EUCAST ve CLSI'nın sınır değer bildirmediği tigesiklin için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından anaeroplara için önerilen sınır değerleri (duyarlı:<4 µg/ml, orta duyarlı: 8 µg/ml, dirençli: ≥16 µg/ml) temel alınmıştır⁽¹⁴⁾.

Disk difüzyon metodu: Disk difüzyon metodu için; ampicilin (10 µg), ampicilin/sulbaktam (10/10 µg), sefoksitin (30 µg), imipenem (10 µg), tigesiklin (15 µg), klindamisin (10 µg), moksifloksasin (5 µg) ve metronidazol (5 µg) antibiyotik diskleri (Oxoid, Birleşik Krallık) kullanılmıştır⁽¹⁰⁾. Besiyeri olarak EUCAST tarafından kullanılması üzerinde uzlaşmaya varılan Fastidious Anaerobe Agar (FAA) (LabM, Birleşik Krallık) çalışmaya alınmıştır⁽¹⁵⁾. Yüzde 5 oranında at kanı ile zenginleştirilmiş FAA, kalınlığı 4 mm olacak şekilde plaklara aktararak kurumaya bırakılmıştır. Diğer yandan bir gecelik inkübasyon sonrası FAA'dan elde edilen taze kültürden %0.9'luk tuzlu su içinde McFarland 1 bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmış, steril pamuklu eküvyon ile taze FAA'ya, plağın tüm yüzeyine eşit yayılacak şekilde ekim yapılmıştır. Her bir 90 mm ebatlarındaki FAA plağına penset kullanılarak en fazla üç adet antibiyotik diski yerleştirilmiştir. İnokulum hazırlanması, ekim işleminin yapılması ve antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi EUCAST'in önerdiği 15'er (15-15-15) dakika kuralına göre bekletilmeden uygulanmıştır⁽¹⁰⁾. İşlemleri tamamlanan plaklar karanlık (besiyeri üreten firmanın önerisine istinaden) ve anaerop ortamda 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda antibiyotik disklerinin çevresindeki üreme olmayan zon çapı milimetrik cetvel ile ölçülmüş, daha önce yapılan çalışmalardan bildirilmiş sonuçlarla karşılaştırılmış, izolatlarımızın ilgili antibiyotiğe duyarlı (S) ve dirençli (R) olabileceği şeklinde çıkarımlar yapılmıştır. Agarda dilüsyon test sonuçları ile disk difüzyon test sonuçları karşılaştırılarak aralarında bağlantı bulmaya çalışılmıştır.

BULGULAR

Bu çalışmada, 53 hastanın çeşitli klinik örneklerinden üretilmiş 56 BFG izolatı ele alınmıştır. İzolatların

Tablo 1. İzolatların elde edildikleri klinik örnekler göre dağılımı.

BFG bakteriler	Apse	BAI*	Doku	BOS**	Periton sıvısı	Plevra sıvısı	Toplam Sayı (n)
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	15	8	2	2	0	34
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	0	4	0	1	1	2	11
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1	2	1	0	0	0	4
<i>Bacteroides ovatus</i>	0	0	1	0	0	1	2
<i>Bacteroides uniformis</i>	0	0	1	0	0	0	1
<i>Parabacteroides distasonis</i>	0	3	0	0	0	0	4
Toplam Sayı (n)	2	24	11	3	3	3	56

*BIA: Batın içi apse, **BOS: Beyin omurilik sıvısı

Tablo 2. BFG izolatlarının antimikrobiyallere duyarlılık durumları.

Antimikrobiyaller	Sınır değerleri ^a			MİK değerleri (µg/ml)			Duyarlılık profili (%)		
	Hassas	Orta	Dirençli	MİK aralıkları	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Hassas	Orta	Dirençli
Ampisilin	≤0,5		>2	4->256	64	>258	0		100
Ampisilin/sulbaktam	≤4	32	>8	<0.125->64	2	16	66.1		33.9
Sefoksitin ^b	≤16		≥64	4->64	32	>64	68	16	16
İmipenem	≤2		>8	<0.06-64	0.05	2	98.2		1.8
Klindamisin	≤4	8	>4	0.25->256	16	>256	46.4		53.6
Tigesiklin ^c	≤4	4	≥16	0.25-16	1	8	89.3	8.9	1.8
Moksifloksasin ^b	≤2		≥8	0.05->64	4	32	57.1	12.5	30.4
Metronidazol	≤4		>4	0.5-8	0.05	2	98.2		1.8

^aEUCAST klinik sınır değerlerine göre, ^bCLSI klinik sınır değerlerine, ^cFDA klinik sınır değerlerine göre yorumlanmıştır.

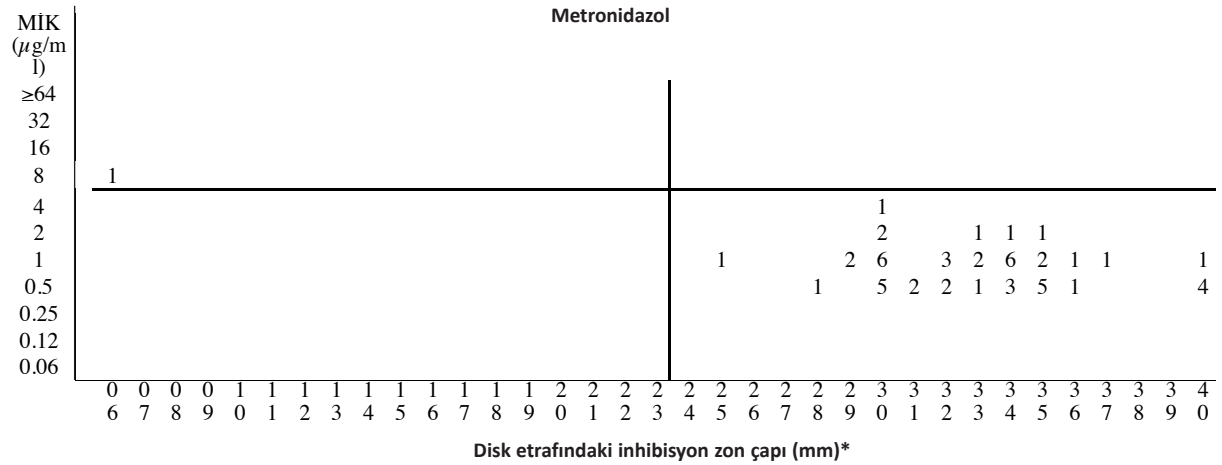
çoğunluğunu *B. fragilis* (n=34, %61), oluşturmuş bunu sırasıyla *B. thetaiotaomicron* (n=11, %20), *B. vulgatus* (n=4), *P. distasonis* (n=4), *B. ovatus* (n=2) ve *B. uniformis* (n=1) izlemiştir. İzolatlarımızın klinik örnekler göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Agarda dilüsyon test sonuçlarımıza göre izolatlarımızın tamamı ampisiline, %33.9'u ampisilin/sulbaktama, %16'sı ise sefoksitine dirençli bulunmuştur. Orta dirençli olanlar da değerlendirmeye katıldığında sefoksitine duyarlı olmayanların oranı %32'ye yükselmiştir. İkinci en yüksek direnç oranı klindamisine karşı (%53.6) saptanmış, bunu %30.4 (orta dirençliler ile birlikte toplam %42.9 oranında duyarlı olmayanlar) oranıyla moksifloksasine direnç izlemiştir. İzolatlar üzerine en etkili görülen antibiyotikler %1.8 direnç oranlarıyla imipenem, metronidazol ve tigesiklin olmuştur.

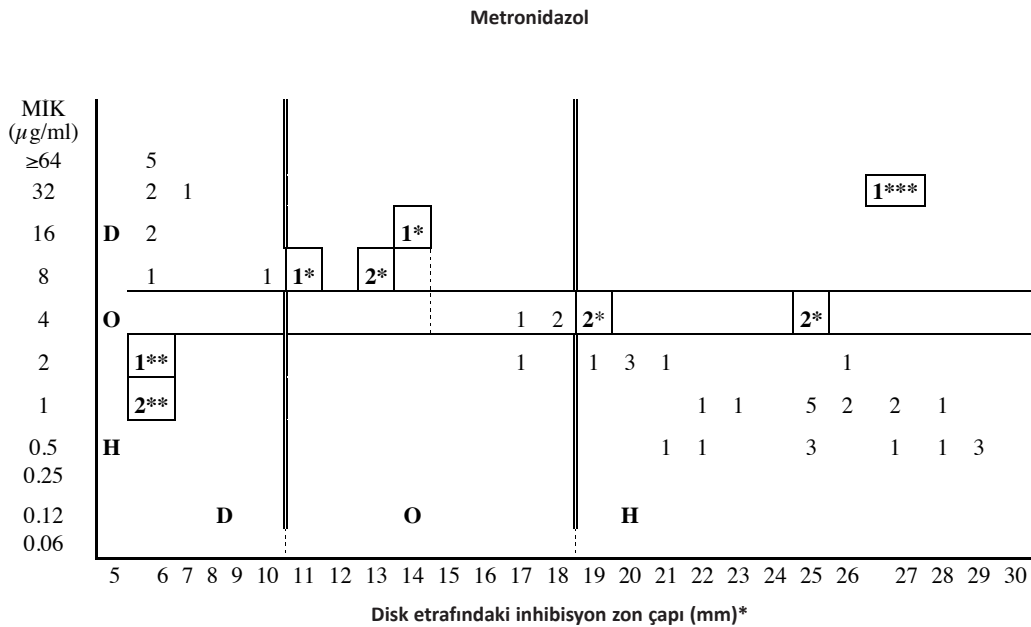
İzolatların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ve CLSI, EUCAST

ve FDA'nın klinik sınır değerlerine göre belirlenmiş antibiyotiklere duyarlılık durumları Tablo 2'de verilmiştir.

Disk difüzyon test sonuçları 24 saatlik inkübasyon sonunda disk etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülerek değerlendirilmiştir. Bakterilerin iyi üredikleri, zon çaplarının düzgün ve net bir şekilde görülebilir olduğu saptanmıştır. Daha önce duyarlılık zon sınır değerleri belirlenen antibiyotiklere (duyarlılık kriterleri; imipenem ≥29 mm, metronidazol ≥24 mm, klindamisin ≥25, moksifloksasin ≥19 mm) göre agarda dilüsyon ve disk difüzyon sonuçlarımızın uyumluluğu araştırılmıştır. Metronidazol için agarda dilüsyon ve disk difüzyon sonuçlarımızda %100 oranında uyumluluk saptanmış ve her iki test ile izolatlar hassas ya da dirençli olarak bulunmuştur. İki test sonuçları arasındaki uyumluluk diğer antibiyotiklerden imipenem için %89, klindamisin için %78.5 ve moksifloksasin için %76.7 olarak saptanmıştır. Uyum oranı daha



Şekil 1. BFG izolatlarının metronidazole karşı MİK değerleri ve aynı izolatların metronidazol diski (5 µg /disk) etrafında oluşturdukları inhibisyon zon ölçümlerinin dağılım şeması.
*inhibisyon zon çapını gösteren 06-40 rakamları alt alta yazılmıştır.



Şekil 2. BFG izolatlarının moksifloksasine karşı MİK değerleri ve aynı izolatların moksifloksasin diski (5 µg /disk) etrafında oluşturdukları inhibisyon zon ölçümlerinin dağılım şeması.
*Küçük hata, **Büyük hata, ***Çok büyük hata veren izolatlar. D; dirençli, O; orta dirençli, H; hassas

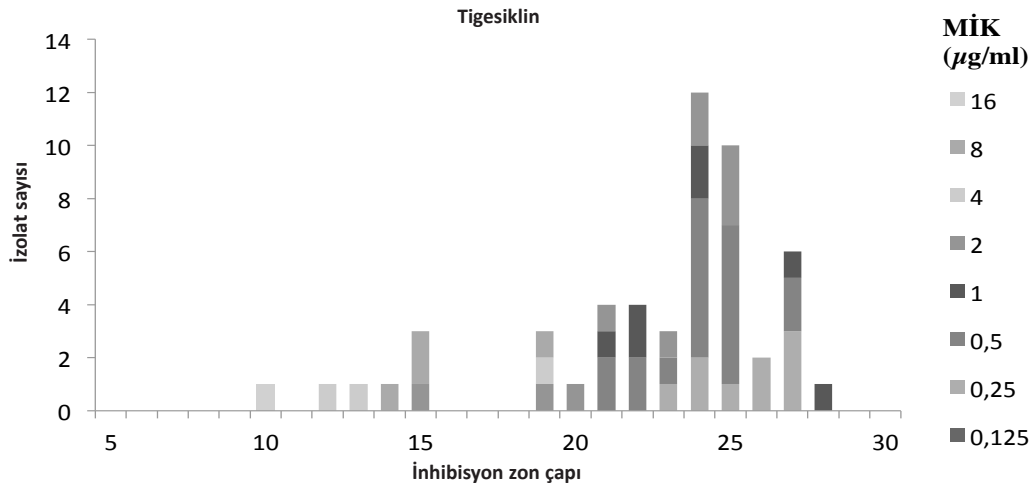
düşük olan klindamisin ve moksifloksasin için tür bazında zon çapında belirgin farklılıkların olduğu gözlenmiştir (Tablo 3'te BFG izolatlarının tür bazında moksifloksasine göstermiş oldukları inhibisyon zon çapları yer almaktadır). Ampisilin/sulbaktam ve sefoksitine duyarlılık sonuçlarında pek kıyaslanabilir değerler bulunamamış, aynı MİK değerlerine sahip izolatlar farklı inhibisyon zon çapları veya aynı zon çaplarına sahip izolatlar farklı MİK değerleri sergile-

yebilmişlerdir. Tigesiklin için disk difüzyon inhibisyon zon çaplarıyla ilgili henüz sınır değerler belirlenmediğinden iki yöntemin sonuçları karşılaştırılamamıştır. Ancak, MİK değerlerine göre duyarlı izolatların (n=50) %92'sinde disk difüzyon testiyle inhibisyon zon çapı 19 mm ve üzerinde bulunmuş, %8'inde ise 12 ile 15 mm arasında veriler elde edilmiştir. MİK sonucuna göre dirençli tek izolat ise 10 mm'lik inhibisyon zonu oluşturmuştur (Şekil 3a, 3b).

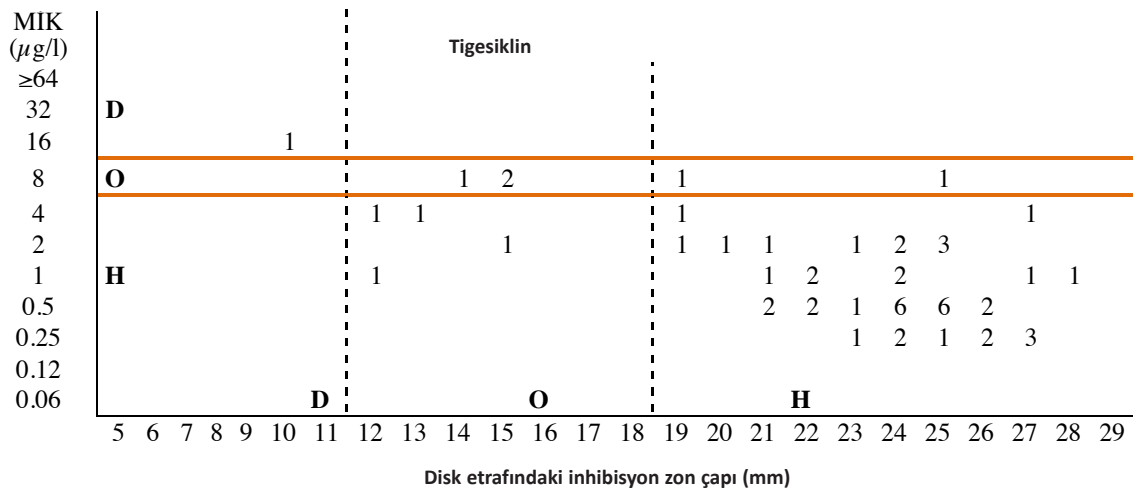
Tablo 3. Şekil 2'deki verilen BFG izolatlarının moksifloksasine karşı disk difüzyon inhibisyon zon çap ölçümlerinin MİK değerlerine göre dağılımı.

MİK (µg/l)	Sayı (n=)	Zon çapı (mm)	Sayı (n=)	Zon çapı (mm)	Sayı (n=)	Zon çapı (mm)	Sayı (n=)	Zon çapı (mm)
0.5	7	21, 25, 25, 28, 29, 29, 29	1	27	2	22, 25	0	-
1	12	6**, 6**, 22, 23, 25, 25, 25, 26, 26, 27, 27, 28	0	-	0	-	2	25, 25
2	2	6**, 27	4	19, 20, 20, 21	0	-	2	20, 17
4	4	17, 18, 19*, 19*	2	15, 25	1	18	0	-
8	5	6, 10, 11*, 13*, 13*	0	-	0	-	0	-
16	2	6, 14*	0	-	1	6	0	-
32	2	6, 27***	2	6, 7	0	-	0	-
≥64	0	-	2	6, 6	0	-	3	6, 6, 6

*Küçük hata, **Büyük hata, ***Çok büyük hata veren izolatlar



Şekil 3a. BFG izolatlarının tigesikline karşı MİK değerleri ve aynı izolatların tigesiklin diski (15 µg /disk) etrafında oluşturdukları inhibisyon zon ölçümlerinin dağılım şeması.



Şekil 3b. BFG izolatlarının tigesikline karşı MİK değerleri ve aynı izolatların tigesiklin diski (15 µg /disk) etrafında oluşturdukları inhibisyon zon ölçümlerinin dağılım şeması. Tigesiklin için disk diffüzyon inhibisyon zon çaplarıyla ilgili henüz belirlenmiş sınır değerler bulunmamaktadır. Verilerimize göre tigesiklin için önerilmesi muhtemel sınır değerleri; "≥19'lar hassas, <12'ler dirençli" olabilir.

D; dirençli, O; orta dirençli, H; hassas

TARTIŞMA

İzolasyonunun ve tanımlanmasının zor, zahmetli ve pahalı olması nedeniyle gerek dünyada gerekse ülkemizde çok az laboratuvar da anaerop bakteri kültürü yapılmaktadır. Anaeroplara bağlı enfeksiyon varlığında antianaerop etkiye sahip olduğu düşünölen antibiyotikler ile ampirik tedavi uygulanmaktadır⁽²⁾. Ancak, son yıllarda giderek artan antibiyotik direnci nedeniyle anaerop bakterilerin, özellikle BFG izolatlarının duyarlılıkları öngörülemez hâle gelmiştir. Ülkelere, şehirlere, merkezlere hatta aynı merkezde farklı kliniklere göre değişiklik göstermekle beraber çalışmalar, karbapenem, piperasilin/ tazobaktam, amoksisilin/klavulanik asit ve metronidazol gibi en aktif antibiyotiklere bile direnç geliştirdiğini göstermiştir^(3,4). Çok ilaca dirençli BFG izolatlarına bağlı olgu bildirimlerinde belirgin bir artış dikkat çekmektedir^(7,8). Bu gelişmeler günlük rutin laboratuvar uygulamalarında, anaerop bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarını belirleyen testlere duyulan gereksinimin büyüklüğünü gözler önüne sermektedir⁽⁹⁾.

Anaerop bakteriler için önerilen duyarlılık testi; agarda dilüsyon metodu, klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin stoklanıp biriktirilerek antibiyotik duyarlılıklarının toplu çalışılması için uygun bir yöntemdir. Rutin laboratuvar uygulamaları için pratik bir yöntem değildir⁽¹²⁾. Alternatif bir yöntem olarak anaeroplara uyarlanan, özel durumlarda, seçilmiş birkaç antibiyotik için kullanılabilen gradyan strip testi (E-testi) ise pahalıdır, düşük gelirli ölkelerdeki laboratuvarlarda düzenli olarak kullanılması mümkün değildir⁽¹⁶⁾. Günümüzde rutin laboratuvar uygulamalarında, anaerop bakteriler için kullanılacak ucuz, basit ve güvenilir sonuçlar veren duyarlılık yöntemi arayışları sürmektedir. Aerop bakteriler için kullanılan disk difüzyon yönteminin *Clostridiodes difficile* ve BFG bakteriler gibi çabuk üreyen organizmaların duyarlılıklarını belirlemede çözüm olabileceği düşünülmüş ve bazı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. Erikstrup ve ark.⁽¹⁷⁾, hastanede yatan ishali hastalardan izole edilmiş, gradyan strip testi ile metronidazol veya vankomisine duyarlılığı azalmış, moksifloksasin veya rifaksimine dirençli olduğu saptanan *C. difficile* izo-

latlarının disk difüzyon yöntemiyle aynı antibiyotiklere duyarlılıklarını araştırmışlar, iki yöntem sonuçları arasında kusursuz bir uyum saptamışlardır. Aynı çalışma grubu, rutin laboratuvar uygulamalarında disk difüzyon yönteminin *C. difficile* izolatlarının duyarlılığını belirlemede kullanılabileceğini deneyimlemiştir⁽¹⁸⁾.

Bacteroides izolatlarının duyarlılıklarını belirlemede disk difüzyon yönteminin uygunluğunu saptamak için kapsamlı bazı çalışmalar yapılmıştır. Çeşitli besiyerleri, inkübasyon koşulları denenmiş, EUCAST'ın anaeroplara için belirlediği sınır değerler kullanılarak yapılan ilk karşılaştırmalı çalışma, 2013 yılında ECCMID Kongresinde sunulmuştur⁽¹⁹⁾. Toplam 104 BFG izolatının ele alındığı, besiyeri olarak koyun kanı, hemin ve K vitaminiyle zenginleştirilmiş Brucella agar, antibiyotiklerden piperasilin /tazobaktam, meropenem, klindamisin ve metronidazol antibiyotik disklerinin kullanıldığı bu çalışmada agarda dilüsyon MİK değerleriyle uyumlu sonuçlar alınmıştır. Nagy ve ark.⁽¹⁰⁾ tarafından yapılan, daha geniş bir bakteri topluluğu (n=381) ve dokuz antibiyotiğin ele alındığı, koyun kanlı Brucella agarın kullanıldığı çalışmada, disk difüzyon duyarlılık testinin günlük rutin laboratuvar çalışmalarında uygulanabilir bir yöntem olduğunu göstermiştir. Uyumlu sonuçlar alınmakla beraber, deney koşullarıyla ilgili optimizasyon sürmektedir^(20,21). Bakterilerin üremesini daha fazla arttırdığı, piyasada daha kolay bulunabilir olduğu savıyla koyun kanıyla zenginleştirilmiş Brucella agar yerine at kanı eklenmiş FAA kullanılması kararlaştırılmış ve son çalışmalar at kanıyla zenginleştirilmiş FAA besiyeriyle alınan sonuçlara yoğunlaştırılmıştır⁽²²⁾.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş BFG bakterilerinin duyarlılıkları at kanıyla zenginleştirilmiş FAA kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiş, anaeroplara için standart yöntem olan agarda dilüsyon testiyle elde edilen MİK değerleriyle karşılaştırılmıştır. Antibiyotik diskleri, CLSI ve EUCAST klavuzlarında önerilen gram negatif anaerop bakterilerin duyarlılıklarını belirlemek için kullanılan antibiyotiklere göre seçilmiştir. Çalışmanın bütün basamaklarında inokölüm miktarından, besiyeri kalınlığına, inkübasyon sıcaklığı ve süresinden ve karanlık

ortamda tutulmasına kadar önerilen konulara titizlikle uyulmuştur. Testlerin değerlendirme aşamasında, inkübasyon sonrasında iyi üreme ve antibiyotik diskleri etrafında net inhibisyon zonları saptanmıştır.

İki duyarlılık testi arasındaki en yüksek benzer sonuçlar, %100 uyumla metronidazol ile yaklaşık %90 uyumla imipenem ile alınmıştır. Bu iki antibiyotikle uyumlu sonuçların alınması önemlidir. Bakteriyemi gibi invaziv enfeksiyonlarda tercih edilecek bakterisidal antibiyotikler karbapenemler ve metronidazoldür^(22,23). Günümüzde kullanılan kan kültür cihazlarıyla kanda üreme kısa sürede belirlenebilmektedir. Anaerob kültür pratiği olan laboratuvarlarda, üremeli kan kültür şişesinden yapılan ekimden 24 saatlik inkübasyon sonrası BFG bakteri kültürü elde edilebilmektedir⁽²⁴⁾. Kültürden yapılan disk difüzyon testiyle bakterilerin bu antibiyotiklere duyarlılıkları belirlenebilecektir. Hastanemizde karbapenemlere dirençli *Bacteroides* oranı diğer ülkelerdeki direnç oranlarına göre daha yüksektir⁽²⁵⁾. Bunun yanı sıra hastanemizde metronidazole dirençli *Bacteroides*'lere bağlı bakteriyemi olguları da saptanmıştır⁽²⁶⁾. Özellikle bakteriyemi etkeni BFG bakterilerinin kısa sürede tanımlanması, metronidazole ve imipeneme duyarlılıklarının belirlenmesi tedavinin başarılı olmasında önemlidir^(22,23).

İzolatlarımız üzerine imipenem ve metronidazolden sonra en etkili antimikrobiyallerden tigesiklin için disk difüzyon inhibisyon zon çapıyla ilgili henüz belirlenmiş sınır bir değer bulunmadığı için iki test arasındaki uyum hesaplanamamıştır. Verilerimize göre tigesiklin için önerilmesi muhtemel sınır değerlerinin "≥19 mm hassas, 18-12 mm orta dirençli ve <12'ler dirençli" olabileceğini düşünüyoruz (Şekil 3a, 3b). Bu değerler baz alındığında MİK değerleri ile disk difüzyon test sonuçları arasında %89.3 oranında uyum, %10.3 oranında minor hata (agar dilüsyon yönteminde duyarlı olup, disk difüzyon testiyle orta dirençli olanlar n=2, agar dilüsyon yönteminde orta dirençli olup, disk difüzyon testiyle duyarlı olanlar n=4) varlığından söz edebiliriz. Bu değerlendirmeye göre büyük hata veya çok büyük hatanın olmaması, tigesiklin için disk difüzyon testinin kullanılabilmesini düşündürmektedir.

Diğer antibiyotiklerden klindamisin ve moksifloksasin ile yapılan testlerde %75'ten daha yüksek oranda uyum gözlenmiştir. Ancak, bu oran kabul edilir (≥90) orandan düşüktür ve rutin laboratuvar pratiğinde kullanılması olası değildir. Tür düzeyinde değerlendirildiğinde, iki test arasındaki uyum oranı da değişiklik göstermektedir. Örneğin, moksifloksasin için küçük hata, büyük hata ve çok büyük hata veren izolatların daha çok *B. fragilis* türleri arasında yer aldığı görülmektedir. Çok sayıda bakterinin ele alındığı, özellikle tür düzeyinde yapılacak çalışmalar ile disk difüzyon testinin bu antibiyotikler için optimize edilmesi gereklidir. Gerek dünyada gerekse ülkemizde bu antimikrobiyallere yüksek oranda direnç bulunmaktadır, duyarlılık sonuçları saptanmadan ampirik tedavide kullanılmaları önerilmemektedir^(4-6,27-30). Bu nedenle BFG izolatlarının klindamisin ve moksifloksasine duyarlılıklarının belirlenmesi uygun antimikrobiyalin seçilmesinde önemlidir.

Ampisilin/sulbaktam ve sefoksitin diskleriyle yapılan çalışmalar pek tutarlı sonuçlar vermemiştir. Aynı MİK değerine sahip bazı organizmalar farklı disk inhibisyon zonu oluştururken, aynı disk zonu çapına sahip organizmalar farklı MİK değerleri göstermişlerdir. Daha önceki çalışmalarda da beta-laktam grubu antibiyotiklerin benzer sonuçlar sergiledikleri belirtilmiştir^(10,15,21).

Test edilen izolat sayısının az olması çalışmamızın zayıf tarafını oluşturmaktadır. Daha fazla bakteriyi dâhil ederek optimize edilen çalışmalar ile bu eksikliklerin giderileceğine inanıyoruz. Bu zayıf tarafına karşın ileride yapacağımız çalışmalara kaynak oluşturması bakımından verilerimizin değerli olduğunu düşünüyoruz.

Sonuç olarak, BFG bakterilerinin, bu bakterilere bağlı enfeksiyonların tedavisinde etkili bir şekilde kullanılan antimikrobiyallerden metronidazol, imipenem ve tigesikline duyarlılıklarını belirlemede disk difüzyon yönteminin kolaylıkla uygulanabilir, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu söylenebilir. Ancak, bir standardın oluşturulması adına, özellikle diğer antimikrobiyaller için daha fazla izolatın ele alındığı, deney koşullarının optimize edildiği çalışmaların yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Teşekkür

Disk difüzyon testinde kullanmamız için bize FAA besiyerini hediye eden İşveçli bilim insanı Prof. Dr. Erika Matuschek'e (EUCAST Geliştirme Laboratuvarı, Växjö Merkez Hastanesi Växjö, İsveç) teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı: Çalışma, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu'nun, 17.12.2018 tarih ve 254 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, Marmara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-C-YLP-100719-0261 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Marmara University Ethics Committee (12.17.2018-254).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: Marmara University Scientific Research Projects Unit (Project No. SAG-C-YLP-100719-0261).

KAYNAKLAR

1. Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. Clin Microbiol Rev. 2007;20(4):593-621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>
2. Schuetz AN. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. Clin Infect Dis. 2014;59(5):698-705. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu395>
3. Cooley L, Teng J. Anaerobic resistance: should we be worried? Curr Opin Infect Dis. 2019;32(6):523-30. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000595>
4. Boyanova L, Kolarov R, Mitov I. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. Anaerobe. 2015; 31:4-10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.004>
5. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, et al. Trends in antimicrobial resistance among *Bacteroides* species and *Parabacteroides* species in the United States from 2010-2012 with comparison to 2008-2009. Anaerobe. 2017; 43:21-6. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.11.003>
6. Nagy E, Urbán E, Nord CE, et al. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. Clin Microbiol Infect. 2011;17(3):371-9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03256.x>
7. Sóki J, Hedberg M, Patrick S, et al. Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates. J Antimicrob Chemother. 2016;71(9):2441-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw175>
8. Merchan C, Parajuli S, Siegfried J, Scipione MR, Dubrovskaya Y, Rahimian J. Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* bacteremia in a US resident: An emerging challenge. Case Rep Infect Dis. 2016; 2016:3607125. <https://doi.org/10.1155/2016/3607125>
9. Nagy E, Schuetz A. Is there a need for the antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria? Anaerobe. 2015;31:2-3. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.11.002>
10. Nagy E, Justesen US, Eitel Z, et al. Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates. Anaerobe. 2015;31:65-71. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.10.008>
11. Nagy E, Boyanova L, Justesen US, et al. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories, Clin Microbiol Infect. 2018;24(11):1139-48. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.008>
12. CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, Approved Standards-7th Edition, M11-A7, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, ABD, 2007.
13. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical breakpoints 2017. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
14. Tygacil®, 2010 Federal Drug Administration, Product Information, Pfizer Inc., Collegeville, PA, ABD.
15. Bavelaar B, Matuschek E, Morris T, et al. Performance of a new EUCAST disk diffusion method using fastidious anaerobe agar (FAA) for clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 21-24 Nisan 2018, Madrid, İspanya: P0161.
16. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ, Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria, J Clin Microbiol. 1991;29(10):2197-203. <https://doi.org/10.1128/JCM.29.10.2197-2203.1991>
17. Erikstrup LT, Danielsen TK, Hall V, et al, Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. Clin Microbiol Infect. 2012;18(8): E266-72. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03907.x>

18. Holt HM, Danielsen TK, Justesen US. Routine disc diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* and association with PCR ribotype 027. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(11): 2243-6.
<https://doi.org/10.1007/s10096-015-2475-x>
19. Luu H, Thomsen MD, Hansen F, Citron DM, Kahlmeter G, Justesen US. Disc diffusion antimicrobial-susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group using EUCAST clinical minimum inhibitory concentration (MIC) breakpoints, 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 27-30 April 2013, Berlin, Almanya: P1577.
20. Dubreuil L, Members of the CA-SFM 2019. Improvement of a disk diffusion method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria, French recommendations revisited for 2020. *Anaerobe.* 2020;64:102213.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102213>
21. Ho PL, Yau CY, Ho LY, et al. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group organisms in Hong Kong by the tentative EUCAST disc diffusion method. *Anaerobe.* 2017;47:51-6.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.04.005>
22. Bavelaar H, Justesen US, Morris T, Kahlmeter G, Matuschek E. Development of a EUCAST disk diffusion method for rapidly growing anaerobic bacteria using fastidious anaerobe agar (FAA). 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 21-24 Nisan 2018, Madrid, İspanya: P0160.
23. Kim J, Lee Y, Park Y, et al. Anaerobic bacteremia: Impact of inappropriate therapy on mortality. *Infect Chemother.* 2016;48(2):91-8.
<https://doi.org/10.3947/ic.2016.48.2.91>
24. Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ, et al, Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. *Clin Infect Dis.* 2000;30(6):870-6.
<https://doi.org/10.1086/313805>
25. Toprak NU, Uzunkaya OD, Ski J, Soyletir G. Susceptibility profiles and resistance genes for carbapenems (cfiA) and metronidazole (nim) among *Bacteroides* species in a Turkish University Hospital. *Anaerobe.* 2012;18(1):169-71.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.10.004>
26. Toprak lger N, Sayın E, Soyad A, Dane F, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilen ilk metronidazole dirençli *Bacteroides* kökeni: *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Mikrobiyol Bul.* 2013;47(4):717-21.
<https://doi.org/10.5578/mb.5064>
27. Ulger Toprak N, Celik C, Cakici O, Soyletir G. Antimicrobial susceptibilities of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* strains isolated from clinical specimens and human intestinal microbiota. *Anaerobe.* 2004;10(5):255-9.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2004.05.005>
28. DoĒan M, Baysal B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(2):211-9.
29. Demir C, Keli R. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen gram-negatif anaerop basillerin tiplendirilmesi ve antibiyotik direnç profillerinin E-test yöntemi ile belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2018;52(1):72-9.
<https://doi.org/10.5578/mb.66175>
30. Demirci M, Gemicioglu B, Saribas S, et al. A retrospective analysis of anaerobic bacteria isolated in 236 cases of pleural empyema and their prevalence of antimicrobial resistance in Turkey. *Clin Lab.* 2018;64(7):1269-77.
<https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2018.180317>