



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

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ANAEROB BAKTERİLERİN TIPLENDİRİLMESİ VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Dr. Tunzala ASGAROVA

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Filiz KİBAR**

ADANA, 2021



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

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ANAEROB BAKTERİLERİN TİPLENDİRİLMESİ VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Dr. Tunzala ASGAROVA

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Filiz KİBAR

Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TTU-2020-13333 No' lu proje ile desteklenmiştir

ADANA, 2021

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince büyük katkı ve emeği olan, beni her konuda teşvik ederek iyi bir eğitim almamı sağlayan tez danışmanım Doç.Dr. Filiz KİBAR'a ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Fatih Köksal'a, eğitimimde faydalandığım hocalarım Prof. Dr. Fügen YARKIN, Prof. Dr. M.Macit İLKİT, Prof. Dr. Akgün YAMAN'a ve birlikte çalıştığımız, bilgi paylaşımında bulunduğumuz asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Uzmanlık eğitimim süresince Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm laboratuvar personeline yaptıkları katkılardan dolayı minnettarım.

Dr. Tunzala ASGAROVA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bakterilerin Oksijen İhtiyacı	3
2.2. Anaerob Bakterilerin Tarihçesi	5
2.3. Taksonomi.....	5
2.3.1. Gram Negatif Anaerob Basiller	6
2.3.1.1. <i>Bacteroides</i>	6
2.3.1.2. <i>Fusobacterium</i>	9
2.3.1.3. <i>Prevotella</i>	12
2.3.1.4. <i>Porphyromonas</i>	13
2.3.2. Anaerob Koklar	14
2.3.2.1. Gram Pozitif Koklar.....	14
2.3.2.2. Gram Negatif Koklar	15
2.3.3. Gram Pozitif Basiller	16
2.3.3.1. Sporsuz Gram Pozitif Basiller	16
2.3.3.1.1. <i>Actinomyces</i>	16
2.3.3.1.2. <i>Propionibacterium</i>	17
2.3.3.1.3. <i>Bifidobacterium</i>	18
2.3.3.1.4. <i>Eubacterium</i>	19
2.3.3.2. Sporlu Gram Pozitif Basiller.....	19
2.3.3.2.1. <i>Clostridium Difficile</i>	19
2.3.3.2.2. <i>Clostridium Perfringens</i>	21
2.3.3.2.3. <i>Clostridium Botulinum</i>	24

2.3.3.2.4. <i>Clostridium Tetani</i>	25
2.4. Mikrobiyota Üyeleri ve Enfeksiyon Etkenleri Olarak Anaeroblar	27
2.5. Anaerobik Mikrobiyoloji İçin Numunelerin Toplanması ve Taşınması İçin Temel Gereksinimler	29
2.6. Laboratuvarında Örneklerin İşlenmesi	30
2.7. Anaerob İnkübasyon Teknikleri	32
2.8. Anaerob Bakterilerin İdentifikasyonu	33
2.9. Anaerob Bakterilerin Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	34
2.10. β -Laktamaz Testi	37
2.11. Disklerle Yapılan İdentifikasyon	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Gereç	39
3.1.1. Kullanılan Besiyerleri	39
3.1.2. VITEK 2 (Biomerieux, France)	40
3.1.3. Kalite Kontrol Suşları	40
3.1.4. Nitrocefın Disk	40
3.2. Yöntemler	41
3.2.1. Kontrol Suşların Çalışılması	41
3.2.2. Örneklerin Toplanması	43
3.2.3. Örneklerin Taşınması	43
3.2.4. Örneklerin İncelenmesi	44
3.2.4.1. Makroskobik inceleme	44
3.2.4.2. Mikroskobik İnceleme	44
3.2.5. Kültür	45
3.2.6. İdentifikasyon	47
3.2.7. E-Testlerin Yapılması ve Değerlendirilmesi	48
3.2.8. Nitrocefın Testinin Yapılması	49
4. BULGULAR	50
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇLAR	64
KAYNAKLAR	65

TABLO LİSTESİ

Tablo No:

Sayfa No:

Tablo 1. Klinik önemi olan ve/veya klinik örneklerden sıklıkla izole edilen anaerob bakteriler (19).	6
Tablo 2. Bacteroides fragilis'in sınıflandırılması	7
Tablo 3. Klinik olarak önemli bazı enfeksiyonlarda anaerob bakterilerin tespit oranları (194, 195, 197, 198).....	28
Tablo 4. Anaerobik kültür için çeşitli örneklerin uygunluğu (195, 198, 199, 200, 201, 202).....	30
Tablo 5. Rutin duyarlılık testinin önerildiği anaerobik bakterilerin listesi, CLSI, 2019 (10,93).....	35
Tablo 6. Anaerobik izolatlar arasında rutin duyarlılık testine dahil edilmesi gereken antimikrobiyal ajanlar CLSI 2019 (10, 93)	35
Tablo 7. Anaerobik bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık testi için mevcut yöntemler (212).....	36
Tablo 8. İdentifikasyon diskleri ile anaerob bakterilerin ön tanısı (215).....	38
Tablo 9. Üreyen bakterilerin hastanın yaşı ve cinsine göre dağılımı.....	51
Tablo 10. Çalışmaya alınan klinik örneklerin türü ve üreyen bakterilerin bu örneklerle göre dağılımı	52
Tablo 11. Örnek tiplerine göre anaerob bakterilerin dağılımı	52
Tablo 12. Mikroskopik inceleme ve antibiyotik disklerle yapılan identifikasyon sonuçları.....	53
Tablo 13. Anaerob bakteriler için CLSI Klinik Sınır Değeri (212).....	55
Tablo 14. İzole edilen anaerob bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık profilleri ve β- laktamaz sonuçları.....	56
Tablo 15. İzole edilen anaerob bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık oranları.....	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No:

Sayfa No:

- Şekil 1. *Fusobacterium*un sınıflandırılması (48) 10
- Şekil 2. *Fusobacterium nucleatum*'un oral biyofilmlerdeki düzenleyici rolü (53) 11
- Şekil 3. Anaerob inkübasyon teknikleri: A- GasPak sistemi. B- AnaeroPack poşet. C- Anaerobik oda 33
- Şekil 4. Kontrol suşları (Çalışmamızdan). A- *B.fragilis* ATCC 25285 ve *C.difficile* ATCC 700057 kontrol suşları. B- Kontrol suşlarının canlandırılması 41
- Şekil 5. Kontrol suşların koloni morfolojisi(Çalışmamızdan). A - *C.difficile* ATCC 700057 suşunun koloni morfolojisi. B - *B.fragilis* ATCC 25285 suşunun koloni morfolojisi. 42
- Şekil 6. Kontrol suşların disklerle tanımlanması (Çalışmamızdan). A- *C.difficile* ATCC 700057 suşunun Vancomisin (5mg), Kolistin (10mg), Kanamisin (1000 mg) diskleri ile tanımlaması. B- *B.fragilis* ATCC 25285 suşunun Vancomisin (5mg), Kolistin (10mg), Kanamisin (1000 mg) diskleri ile tanımlaması. 42
- Şekil 7. Kontrol suşları, Brucella Broth Agar'da E-Test görüntüleri (Çalışmamızdan)..... 43
- Şekil 8. Bazı anaerob bakterilerin gram boyama görüntüleri (Çalışmamızdan): A- Gram negatif basiller, B-Gram pozitif koklar, C- Bol polimorfonükleer lökosit, gram negatif basiller, D- Gram pozitif basiller 44
- Şekil 9. Bazı anaerob bakterilerin Schaedler agar + %5 Sheep Blood besiyerinde kültür görünüşleri (Çalışmamızdan); A- *Prevotella bivia*, B- *Actinomyces naeslundii*, C- *Propionibacterium acnes*, D- *Fusobacterium necrophorum*, E- *Anaerococcus prevotii*, F- *Bacteroides fragilis*..... 46

Şekil 10. Anaerop ortamın, metilen mavisi emdirilmiş kâğıt stripler (Merck KGaA, Germany) ile kalite kontrolü (Çalışmamızdan).	47
Şekil 11. Disklerle yapılan identifikasyon (Çalışmamızdan). A- Kolistin hassas (22 mm), Kanamisin dirençli, Vankomisin dirençli. B- Kanamisin hassas (16 mm), Vankomisin hassas (19 mm), Kolistin dirençli.....	47
Şekil 12. Brucella Broth Agar’da E-Test yöntemi ile <i>Propionibacter acnes</i> ’in antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi (Çalışmamızdan).....	48
Şekil 13. Brucella Broth Agar’da E-Test yöntemi ile <i>Actinomyces naeslundii</i> ’nin antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi (Çalışmamızdan).....	48
Şekil 14. Brucella Broth Agar’da E-Test yöntemi ile <i>Bacteroides fragilis</i> ’in antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi (Çalışmamızdan).....	49
Şekil 15. Nitrocefin disk testi (Çalışmamızdan). A-Nitrocefin disk testi negatif. B- Nitrocefin disk testi pozitif (Sarı renk pembe/kırmızıya dönüşmüş)	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATB	: Anaerobik transport besiyerine
ATCC	: American Type of Culture Collection
ATD	: Antimikrobiyal duyarlılık testleri
ATP	: Adenozin Trifosfat
BBA	: Brucella Broth Agar
BFT	: <i>B.fragilis</i> toksini
BV	: Bakteriyel vajinoz
°C	: Santigrat derece
CFU	: Colony-forming Units
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CO₂	: Karbondioksit
CPA	: Alpha-toxin
CPB	: Beta-toxin
CPE	: Enterotoxin
ESCMID	: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
ETBF	: Enterotoksijenik <i>B. fragilis</i>
ETX	: Epsilon-toxin
EUCAST	: European Committee on AntiMİKrobial Susceptibility Testing
GPAK	: Gram-pozitif anaerop koklar
GR	: Germinant reseptör
H₂	: Hidrojen
H₂S	: Hidrojen sülfür
IDS	: Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği ve
ITX	: İota-toxin
İBH	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı
KKS	: Kalite Kontrol Suşları
MALDI-TOF MS	: Matrix-Aracılı Lazer Desorpsiyon-Kütle Spektrofotometrisi
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
N₂	: Azot
NAD	: Nikotinamid Adenindinükleotit

NetB	: Necrotic enteritis B-like toxin
NTBF	: Toksik olmayan <i>B. fragilis</i>
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFO	: Perfringolizin O
PRAS	: Pre-Reduced, Anaerobically Sterilized
R	: Dirençli
S	: Hassas
SHEA	: Derneği Amerika Sağlık Hizmetleri Epidemiyolojisi
TeNT	: Tetanoz toksini
THIO	: Tiyoglikolat
UV	: Ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
µg	: Mikrogram
µg/ml	: Mikrogram/mililitre

ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen Anaerob Bakterilerin Tiplendirilmesi ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Sunulan bu çalışmada, anaerobik enfeksiyondan şüphelenilen hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen anaerob bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışma Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, 15 Ocak 2021-1 Kasım 2021 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Toplam 863 örnekten anaerob kültür istemi yapıldı. Anaerob kültür için uygun olan sadece 213 örnek çalışmaya alındı. Anaerob bakteri izolasyonu yapılan 22 (%10.3) örnekten, 17'sinde (%7.98) sadece anaerob bakteri, 5 örnekte (%2.3) hem aerob hem de anaerob bakteri üremesi oldu. 74 örnekte (%34.7) sadece aerob/fakültatif anaerob üremesi görüldü, 119 örnekte (%55.86) ise üreme görülmedi. İzole edilen anaerob gram-negatif basiller, konvansiyonel yöntemler ve otomatize tanı sistemi (VITEK 2, bioMerieux, Fransa) ile tanımlandı. Çalışmada izole edilen anaerob bakteriler çoğunlukla apse (11/22; %50) materyallerinden idi. Kültüre alınan 213 örneğin 164'ü (%77) apse idi ve apse örneklerinin 11'inde (%6.7) anaerobik bakteri izole edildi. Toplam 22 anaerob bakteri izolatının 12'si erkek (%54.5) ve 10'u kadın hastalardan (%45.5) elde edildi. Anaerob bakteri üremesi olan hastalardan 2'si (%9) 18 yaş altı, 17'si (%77.2) 18-60 yaş arası ve 3'ü (%13.6) 60 yaş üstü idi. Anaerob izolatların 6'sının (%27.2) gram negatif, 16'sının (%72.7) gram pozitif (bunlardan 12'sinin (%54.54) gram pozitif basil, 3'ünün (%18.18) gram pozitif kok) olduğu görüldü. En yaygın izole edilen organizmalar sırası ile *Cutibacterium* türleri (%22.7 n= 5), *Actinomyces* türleri (%18.1 n=4), *Prevotella* türleri (%13.6 n=3), *Bacteroides* türleri (%9 n=2), *Anaerococcus* türleri (%9 n=2), *Clostridium* türleri (%9 n=2) idi.

Ampisillin, klindamisin, sefoksitin, metronidazol, moksifloksasin, meropenem, klindamisin, piperasilin-tazobaktam ve amoksisilin-klavulanik asit duyarlılıkları her izolat için antibiyotik konsantrasyon gradiyent yöntemi (E test, bioMerieux, Fransa) ile belirlendi.

En aktif antimikrobiyal ajanlar moksifloksasin (%95.5), piperasilin-tazobaktam (%95.5) ve amoksisilin-klavulanik asit (%95.5) idi. Daha az aktif olanlar sırasıyla sefoksitin (%90.9), meropenem (%90.9), klindamisin (%77.3), ampisillin (%59.1) ve metronidazol (%22.7) idi. Antibiyotik duyarlılık testi yapılan anaerob izolatların ampisillin duyarlılık oranı %59.1 idi. Gram pozitif basil ve koklara karşı toplam duyarlılık yüzdesi %81.25 (gram pozitif basiller %91.7, gram pozitif koklar %50) iken, gram negatif anaerob bakterilerin hepsinde (%100) direnç gözlemlendi. Meropenem antibiyotiğine %90.9 duyarlılık görüldü. Gram pozitif bakterilerin %87.5'inin (gram pozitif basiller %91.7, gram pozitif koklar %75), gram negatif bakterilerin %100'ünün duyarlı olduğu gözlemlendi. Metronidazol antibiyotiğine ise %22.7 oranında duyarlılık görüldü. Direnç esas olarak gram pozitif anaerob bakterilerde (%100) gözlemlenmesine karşın metronidazol gram negatif basillerin çoğuna karşı (%83.3) iyi aktivite göstermiştir. Klindamisine duyarlılık %77.3 oranında gözlemlendi. Bu oran gram pozitif ve gram negatif izolatlar arasında değişmekte olup, gram pozitif bakterilerin %81.3'ü (gram pozitif basiller %75, gram pozitif koklar %100), gram negatif basillerin ise %50'si duyarlıdır. Sefoksitine duyarlılık %90.9 oranında görüldü. Gram pozitif

bakterilerin %87.5'i (gram pozitif basiller %91.7, gram pozitif koklar %100), gram negatif bakterilerin %66.7'si duyarlı, %33.3'ü ise orta hassas olarak görüldü.

Anahtar Sözcükler: Anaerob, VITEK, Antibiyotik, E-test



ABSTRACT

Typing of Anaerobic Bacteria Isolated from Clinical Samples and Determination of Antibiotic Resistance Profiles

This study was conducted to identify anaerobic bacteria isolated from various clinical specimens obtained from patients with suspected anaerobic infection and to determine their antibiotic resistance profiles. The study was carried out in Adana Çukurova University Balcalı Hospital Medical Microbiology Laboratory between January 15, 2021 and November 1, 2021. Anaerobic culture was requested from a total of 863 samples. Routine anaerobic culture was performed on all of the samples requested in our laboratory. However, only 213 samples suitable for anaerobic culture were included in the study. Anaerobic bacteria were isolated in 22 (10.3%) of 213 samples included in the study: only anaerobic bacteria were isolated in 17 samples (7.98%), and both aerobic and anaerobic bacteria were isolated in 5 samples (2.3%). Only aerobic/ facultative anaerobic growth was observed in 74 specimens (34.7%), and no growth was observed in 119 specimens (55.86%). Isolated anaerobic gram-negative bacilli were identified using conventional methods and an automated diagnosis system (VITEK 2, bioMerieux, France). In the study, anaerobic bacteria were mostly isolated from abscess materials. 164 (77%) of the 213 cultured samples were abscesses and anaerobic bacteria were isolated in 11 (6.7%) of the abscess samples. Of the 22 samples with growth, 11 (50%) were abscess samples. A total of 22 anaerobic bacteria isolates were obtained from 12 male (54.5%) and 10 female (45.5%) patients. The number of anaerobic isolates obtained from patients under 18 years of age was 2/22 (9%), 17/22 (77.2%) between 18-60 years of age and 3/22 (13.6%) above 60 years of age. Of the anaerobic isolates, 6 (27.2%) Gr (-) anaerobic bacteria, 16 (72.7%) Gram (+) anaerobic bacteria (12 (54.54%) gram positive bacilli, 3 (18.18%) gram positive bacteria cocc) has been observed. The most commonly isolated organisms were *Cutibacterium* spp. (22.7% n= 5), followed by *Actinomyces* spp. (18.1% n=4), *Prevotella* spp. (13.6% n=3), *Bacteroides* spp. (9% n=2), *Anaerococcus* spp. (9% n=2), *Clostridium* spp. (9% n=2).

The susceptibilities of ampicillin, clindamycin, cefoxitin, metronidazole, moxifloxacin, meropenem, piperacillin-tazobactam and amoxicillin-clavulanic acid were determined for each isolate by antibiotic concentration gradient method (E test, bioMerieux, France).

The most active antimicrobial agents were moxifloxacin (95.5%), piperacillin-tazobactam (95.5%) and amoxicillin-clavulanic acid (95.5%). Less active were cefoxitin (90.9%), meropenem (90.9%), clindamycin (77.3%), ampicillin (59.1%), and metronidazole (22.7%), respectively. The ampicillin susceptibility rate of anaerobic isolates that underwent ADT was 59.1%. The percentage of total susceptibility to Gram positive bacilli and cocci was 81.25% (Gram positive bacilli 91.7%, Gram positive cocci 50%), and Gram negative anaerobic bacteria were all resistant (100%). A sensitivity to meropenem antibiotic was 90.9%. It was observed that 87.5% of Gram positive bacteria (Gram positive bacilli 91.7%, Gram positive cocci 75%) and 100% of Gram negative bacteria were susceptible. Sensitivity to metronidazole antibiotic was 22.7%. Resistance was mainly observed in Gram-positive anaerobic bacteria (100%), showing good activity against most Gram-negative bacilli (83.3%). Sensitivity to clindamycin was observed at a rate of 77.3%. This ratio varies between Gram positive

and Gram negative isolates, and 81.3% of Gram positive bacteria (Gram positive bacilli 75%, Gram positive cocci 100%) and 50% of Gram negative bacilli are susceptible. Sensitivity to Cefoxitin was observed at a rate of 90.9%. 87.5% of Gram-positive bacteria (Gram-positive bacilli 91.7%, Gram-positive cocci 100%), 66.7% of Gram-negative bacteria were susceptible and 33.3% were moderately susceptible.

Keywords: Anaerobic, VITEK, Antibiotic, E-test



1. GİRİŞ

Anaerob bakteriler, ağız boşluğunda ve gastrointestinal sistemde bulunan mikrobiyal floranın önemli bir bileşenini oluşturur. Çoğu koşulda anaerob bakteriler, konakçı ile saprofitik bir ilişkiye sahiptir. Bununla birlikte, anaerobik bakteriler, yıkıcı enfeksiyonlara ve toksemilere neden olabilir. Anaerobik enfeksiyonların/zehirlenmelerin çoğu, cerrahi ve travmatik yaralara, ısırıklara ve iskemiye (örn. arterioskleroz ve diyabetes mellitus) sekonder olarak cansız doku alanlarında gelişir veya toksin üreten organizmaların tüketilmesiyle oluşur (1).

Bağırsak ve ürogenital sistemdeki düşük oksijen konsantrasyonu, bu bölgelerde anaerobik bakterilerin yoğun olarak bulunmasını destekler. Ağız boşluğu ve cilt gibi daha fazla havalandırılmış bölgelerde ise anaeroblar, aerobik/fakültatif bakterilerin oksijeni tükettiği alanlarda birlikte yaşarlar (2).

Anaerobik organizmalar gram negatif basiller, gram negatif koklar, gram pozitif spor oluşturan basiller, gram pozitif spor oluşturmeyen basiller ve gram pozitif anaerobik koklar (GPAC) olarak sınıflandırılır (3,4).

Anaerobik bakterilerin patojen olarak önemi, temel olarak tüm anatomik alanlarda tanımlanmıştır. Bu enfeksiyonlar iki ana gruba ayrılabilir: (i) eksojen veya “klasik” enfeksiyonlar (botulizm, gazlı kangren) ağırlıklı olarak monomikrobiyal, toksin aracılı hastalıklardır. Başlıca etkenler, spor oluşturan gram pozitif basillerdir (*Clostridium* cinsinin üyeleri). (ii) Endojen veya “modern” olarak adlandırılan enfeksiyonlar ise esas olarak polimikrobiyal (karışık aerobik-anaerobik) enfeksiyonlardır. Patojen mikroorganizma, flora üyesi olarak görülmektedir (5,6).

Anaerob bakteriler uygun kültür koşulları uygulandığında, klinik örneklerin yaklaşık %30'undan izole edilirler. En yaygın izole edilen cinsler, *Bacteroides* spp., farklı gram pozitif anaerobik koklar (GPAC), *Prevotella* spp., *Parabacteroides* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Cutibacterium* spp. ve *Clostridium* spp.. Anaerobik kültürden izole edilen çoğu klinik anaerobik suş için rutin antimikrobiyal duyarlılık testi (ADT) gerekli olmayabilir. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), bakteriyemi, beyin apsesi, endokardit, osteomyelit ve eklem enfeksiyonu gibi ciddi enfeksiyonlardan elde edilen izolatların test edilmesini

önerir. Ek olarak, steril vücut bölgelerinden izole edilen veya ampirik tedaviye yanıt vermeyen herhangi bir bakteri de test edilmelidir (7).

Anaerobik bakterilere karşı potansiyel olarak etkili olan antimikrobiyaller arasında β -laktamlar, β -laktamlar ve β -laktamaz inhibitörlerinin kombinasyonları, metronidazol, kloramfenikol, klindamisin, makrolidler, tetrasiklinler ve florokinolonlar bulunur (8).

Anaerobik enfeksiyonların tedavisi çoğu durumda ampirik temele dayalı olarak seçilir (9,10). Bazı türler genetik olarak belirlenmiş direnç mekanizmalarına sahiptir (örneğin, gram pozitif basillerin aerotolerant cinslerinde metronidazol direnci, *Fusobacterium* spp.'de makrolid ve rifampin direnci, *C. difficile*'de sefoksitin direnci) ve metronidazole (*nim* A-K genleri) ve β -laktam antibiyotiklere (*cfx* A ve *cfi* A genleri) karşı direnç gelişimi endişe vericidir (10, 11, 12). Ayrıca çoklu ilaç dirençli (ÇİD) anaerobik suşların sayısının, çoğunlukla *Bacteroides/Parabacteroides* spp., son on yılda artışı, anaerob bakterilerde duyarlılık testinin önemini vurgulamaktadır (13,14).

Anaeroblarda AMD (Antimikrobiyal direnç) ile ilgili veriler azdır çünkü anaeroblarda antimikrobiyal duyarlılık testi (ADT) uygulamaları zahmetli bir süreçtir ve mevcut literatürün çoğu CLSI ve EUCAST kılavuzlarına uymamaktadır (15). Metodolojideki ve CLSI ve EUCAST arasındaki yorumlayıcı sınır değerlerindeki farklılıklar, anaeroblardaki direnç verilerinin değişkenlik göstermesine sebep olmaktadır (10).

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji laboratuvarına gelen klinik örneklerden, enfeksiyon etkeni olabilecek anaerob bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve bu mikroorganizmaların E-test yöntemi ile antimikrobiyal direnç profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız anaerob enfeksiyon etkenlerinin süveyansının izlenmesi ve etkin tedaviye yol gösterilmesi açısından önemli bir veri kaynağı olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bakterilerin Oksijen İhtiyacı

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

Bazı bakteriler ise fermentatif metabolizmaya sahiptirler ve 1 mol glikoz molekülünden 2 mol ATP elde eder. Hücre membranlarında son elektron alıcısı ise nitrat, sülfat gibi inorganik azotlu bileşikler olabileceği gibi, fumarat, siyanür, karbonmonoksit, karbondioksit, polihidrik alkol gibi organik bileşikler de olabilmektedir. Bu bakteriler oksijene gereksinim duymamaktadır. Hatta ortamdaki oksijen varlığı bu bakteriler için zarar vericidir. Bu grup bakterilere ise anaerobik bakteriler denmektedir.

Bakteriler oksijen ve karbondioksit ile olan ilişkilerine göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (16):

I. Anaerob bakteriler: Oksijen varlığında üremesi engellenen bakterilerdir.

A. Zorunlu (obligate) anaerob bakteriler: Zorunlu anaeroblar oksijen varlığında üreyebilme özelliklerine veya oksijene olan tolerans yeteneklerine göre tekrar ikiye ayrılırlar.

a. Kesin zorunlu (obligate) anaeroblar: %0,5 den fazla miktarda oksijen maruz kalınca agar yüzeyinde üreyemezler. Bu bakterilere *Clostridium haemolyticum*, *C. novyi* tip B ve *Selenomonas ruminatum* ve *Treponema denticola* örnek gösterilebilir. Bu bakterilerin on dakika kadar havaya maruz kalmaları canlılıklarını yitirmelerine neden olur.

b. Orta derecede zorunlu (moderate obligate) anaeroblar: Bunlar %2-8 (ortalama %3) aralığındaki oksijen varlığında üreyebilirler. Bu bakterilere örnek olarak *Bacteriodes fragilis*, pigmentli *Prevotella* ve *Porphyromonas* grupları, *Fusobacterium nucleatum* ve *C. perfringens* gösterilebilir. Klinik laboratuvarlarından izole edilen anaerop bakterilerin çoğu orta derecede zorunlu anaeroblardır.

B. Aerotoleran anaeroblar: Oda havasındaki veya %5-10 CO₂ inkübatöründeki agarda kısıtlı üreyen, fakat anaerobik şartlarda iyi üreyen bakteriler için kullanılır. Örnek olarak *C.histolyticum* ve *C.tertium* gösterilebilir.

II. Fakültatif anaeroblar: Aerop ve anaerob şartlar altında üreyebilen bakterilerdir (Ör: *E.coli* ve *S.aureus*). Aerobik solunumu, oksijen varlığında enerji elde etmek için kullanırlarken, oksijen yokluğunda ise fermentasyon ya da anaerobik solunumu kullanırlar. Oksijenli ortamda daha iyi ürerler, çünkü oksijenli ortam daha fazla enerji sağlar

III. Mikroaerofiller: Terminal elektron alıcısı olarak oksijeni kullanırlar. Fakat aerop bir inkübatörde (%21 O₂) bulunan katı besiyerinin yüzeyinde üreme göstermezler ve tamamen anaerob şartlarda ise minimal üreme gösterirler, optimal olarak %5 oksijenli ortamda ürerler (Ör: *C.jejuni*, *B.abortus*).

IV. Zorunlu aeroblar: Üreyebilmeleri için %15-21 oksijene ihtiyacı olan bakterilerdir (Ör: *Mycobacterium*, *C.diphtheriae*).

Anaerob bir bakterinin üretilmesi için iki faktör çok önemlidir:

1. Ortam pH'nın ve ortamdaki oksidasyon-redüksiyon potansiyeli (Eh= redoks potansiyeli) nin uygun olması

2. Ortamdaki hidrojen ve oksijen gazlarının uygun konsantrasyonda olması

Anaerob bakteriler oksijen metabolizmaları için gerekli olan katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimleri ve sitokrom sistemini içermediklerinden, bu bakteriler için oksijen toksik etki göstermektedir. Süperoksit radikalleri, süperoksit dismutaz enzimi ile daha az toksik olan hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülür. Hidrojen peroksit ise katalaz enzimi ile su (H₂O) ve oksijene (O₂) dönüşür.

Bu enzimlerin yokluğunda oksijen metabolizmasının toksik ürünleri olan süperoksit anyonu (O₂⁻) ve serbest hidroksil radikali (OH), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve serbest oksijenin (O₂) birikimine neden olmaktadır ve bunun sonucu olarak da bakteri üzerine toksik etki göstermektedirler (16).

Ortamda oksijen yoğunluğu arttıkça bakteri üzerine iki fazlı hasar oluşmakta; bakteriostatik (faz I) ve/veya bakterisidal (faz II). Faz I evresinde anaerob bakteri oksijenli ortama maruz kaldığında bakterinin gelişiminde yavaşlama ya da tam bir durma meydana gelir, bu etki reversible olabilirken bakteri oksijene maruz kalmaya

devam ederse Faz II dönemine geçiş olur ve bakteri canlılığını yitirir, olay irreversibildir.

2.2. Anaerob Bakterilerin Tarihçesi

Anaerob bakteri enfeksiyonlarının klinik olarak tanımlanması çok eskilere dayanmaktadır. Hipokrat tetanoz hastalığını ilk olarak M.Ö. 4. yüzyılda tarif etmiştir. Fakat anaerob bakterilerin varlığının gösterilmesi ve invitro olarak üretilmeleri yüz yıllar sonra olmuştur. 17. yüzyıl'da, Antonie Van Leeuwenhoek geliştirdiği mikroskopla, havasız ortamda yaşayabilen ve hareket eden canlıların varlığından bahsetmiştir.

Louis Pasteur, 1862'de atmosferik oksijenin yokluğunda *Clostridium butyricum*'un başarılı bir şekilde üretmiştir. Paris Tıp Fakültesi'nden Veillon ve Zuber, 1890'larda pelvik enfeksiyonlar, beyin apsesi, akciğer kangreni ve apandisit dahil olmak üzere birçok anatomik bölgedeki enfeksiyonlardan kokuşmuş akıntının nedeni olarak anaerobik bakterilerin rolüyle ilgili bir dizi önemli makaleler yayınladılar.

Klasik toksin aracılı klostridial sendromlar, botulizm ve tetanoz, on dokuzuncu yüzyılın sonunda iyi tanımlanmıştır. *Clostridium tetani* 1890'da saf kültürde üretildi ve tetanoz aşılama çalışmaları başladı.

Anaerob bakterilerin izolasyonu için gerekli olan anaerop koşulların sağlanmasında kullanılan anaerop kavanozlar, 20'nci yüzyılın ilk çeyreğinde geliştirilmiştir. Clostridium türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar 1960'lı yıllara kadar anaerob bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar içinde en çok incelenen grubu oluşturmuştur. Bunun nedeni olarak da sporsuz anaerop bakterilerin izolasyonunda yaşanan güçlükler gösterilmiştir (17).

2.3. Taksonomi

Son 20 yılda moleküler teknolojilerdeki ilerlemeler, AB'nin taksonomisinde ve sınıflandırmasında çok sayıda değişikliğe yol açmıştır. Çeşitli insan vücudu bölgelerinden ve klinik örneklerden izole edilen Anaerob bakterileri sınıflandırması, 81 cinsi ve 26 aileyi temsil eden çok sayıda türü içerir (18).

Anaerob bakterilerin sınıflandırılmasında temel baz alınan kriterler, bakteri morfolojileri ve bunlara ait fenotipik özellikler olmuştur. Ancak moleküler tanı

tekniklerinin gelişmesiyle birlikte, klasik sınıflandırma yöntemleri ikinci plana itilmiş olup modern sınıflandırmaya geçilmiştir (19). Modern sınıflandırma ile birlikte belirli taksonlar arasındaki ilişki güçlenirken, diğer bazı taksonlar arasındaki ilişki de zayıflamıştır. Yine anaerob bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık profilleri de modern sınıflandırmada önemli bir kriter olmuştur.

Tablo 1. Klinik önemi olan ve/veya klinik örneklerden sıklıkla izole edilen anaerob bakteriler (19).

Gram Negatif Basiller	
<i>Bacteroides fragilis</i> grubu	<i>B. fragilis</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>B. distasonis</i> , <i>B. ovatus</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>B. uniformis</i>
Diğer <i>Bacteroides</i>'ler	<i>B. ureolyticus</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. denticola</i> , <i>P. loescheii</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. corporis</i> , <i>P. tanneriae</i> , <i>P. nigrescens</i>
Pigmentsiz <i>Prevotella</i>	<i>P. oralis</i> grup, <i>P. bivia</i> , <i>P. disiens</i> , <i>P. oris/buccae</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>F. nucleatum</i> , <i>F. necrophorum</i> , <i>F. mortiferum</i> , <i>F. varium</i>
<i>Bilophila wadsworthia</i>	
Anaerob Koklar	
Gram Pozitif Koklar	<i>Peptostreptococcus anaerapius</i> , <i>Finogoldia magna</i> , <i>Micromonas Micros</i> , <i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i> , <i>Anaerococcus prevotii</i> , Mikroaerofilik streptokoklar, (<i>S.intermedius</i> dahil)
Gram Negatif Koklar	<i>Veillonla</i> spp.
Gram Pozitif Basiller	
1- Sporsuz Gram Pozitif Basiller	
<i>Actinomyces</i>	<i>A. israelii</i> , <i>A. meyerii</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>A. viscosus</i>
<i>Propionibacterium/ Cutibacterium</i>	<i>P. propionicum</i> , <i>P. acnes</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium dentium</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>E. limosum</i> , <i>Eggerthella lenta</i> (<i>Eubacterium lentum</i>)
2- Sporlu Gram Pozitif Basiller	
<i>Clostridium</i>	<i>C. perfringens</i> , <i>C. clostridioforme</i> grup, <i>C. inoocuum</i> , <i>C. ramosum</i> , <i>C. difficile</i> , <i>C. bifermentans</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. histolyticum</i> , <i>C. sordelli</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>C. tetani</i>

2.3.1. Gram Negatif Anaerob Basiller

2.3.1.1. *Bacteroides*

İnsan kolonu vücuttaki en büyük bakteri popülasyonuna sahiptir (ıslak ağırlığın gramı başına ondan fazla organizma) ve bu organizmaların en büyük kısmı anaeroblardır; bunların yaklaşık %25'i *Bacteroides* türleridir. *Bacteroides fragilis*, kolonik mikrobiyotanın bir parçasıdır ve *Bacteroides thetaiotaomicron*, mikrobiyotada

B. fragilis'ten daha fazla bulunur ancak bir patojen olarak daha az tanımlanmıştır. İnsanlar *Bacteroides fragilis*'i büyük olasılıkla doğumda alırlar. Yaşamın ilk aylarında bakteri florası önemli ölçüde değişir ve bir yaşına kadar bağırsak mikrobiyotası yetişkin bir mikrobiyota profiline dönüşür (20).

Tablo 2. *Bacteroides fragilis*'in sınıflandırılması

Domain (Grup)	<i>Bacteria</i>
Şube	<i>Bacteroidetes</i>
Sınıf	<i>Bacteroidetes</i>
Takım	<i>Bacteroidales</i>
Aile	<i>Bacteroidaceae</i>
Cins	<i>Bacteroides fragilis</i>

Büyüklikleri 0,5-0,8 µm x 1,5-9 µm arasında değişir. Gram boyamada gram negatif, genellikle basil veya kokobasil şeklinde görülmekle birlikte, vakuollü, bipolar boyanmış ve çoğunlukla kapsüllüdürler. Kapsüllerinin patojenik önemi belirsizdir. Buyyon kültürlerinde pleomorfik olabilir (17, 21). AnBAP (Anaerob Blood Agar Plate) besiyerinde 1-4 mm çapında, hemolizsiz, gri, yarı opak koloniler yapar (17). Besiyerinde hemin bulunmadığında üremesüresi 8 saat iken, hemin ilave edilen besiyerinde bu süre 2 saate düşürmektedir. Hemin sitokrom enzimlerini sentezlemeye katkıda bulunarak, ilave ATP enerjisi oluşturmalarına sebep olur.

Bacteroides, Gram negatif hücre duvar yapısına sahip olmasına rağmen lipid A kısmını içermediği için endotoksinin biyolojik etkisi yoktur. Tümü sakkarolitikdir. Karbonhidrat fermentasyon paternleri identifikasyona yardımcı olur (17).

Bacteroides grubu arasında en yaygın olan cins *B. fragilis*'tir, bunu *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* ve *B. vulgatus* izler (22). *Bacteroides* taksonomisi son birkaç yılda önemli değişiklikler geçirdi (23,24). Son zamanlarda, insan dışkısının mikrobiyotasından birkaç yeni *Bacteroides* türü izole edildi. Bakır, et al., 2006 yılında insan dışkısından *B. finegoldii*, *B. dorei* ve *B. intestinalis* olmak üzere üç yeni tür bildirmiştir (25,26,27). Bundan sonra, *B. finegoldii* ve *B. dorei*'nin neden olduğu ek bakteriyemi vakaları rapor edilmiştir. Ayrıca, *B. nordii* ve *B. salyersiae* ilk olarak 2004 yılında rapor edilmiş ve her iki izolat da periton sıvısı, apendiks dokusu ve karın içi apse gibi bağırsak kaynaklı insan klinik örneklerinden elde edilmiştir (28). *B. faecis*

insan dışkısından izole edildi ve 2010 yılında yeni bir tür olduğu öne sürüldü (29). Ancak, *B. faecis* veya *B. intestinalis*'in neden olduğu herhangi bir enfeksiyon vakası bildirilmemiştir (30).

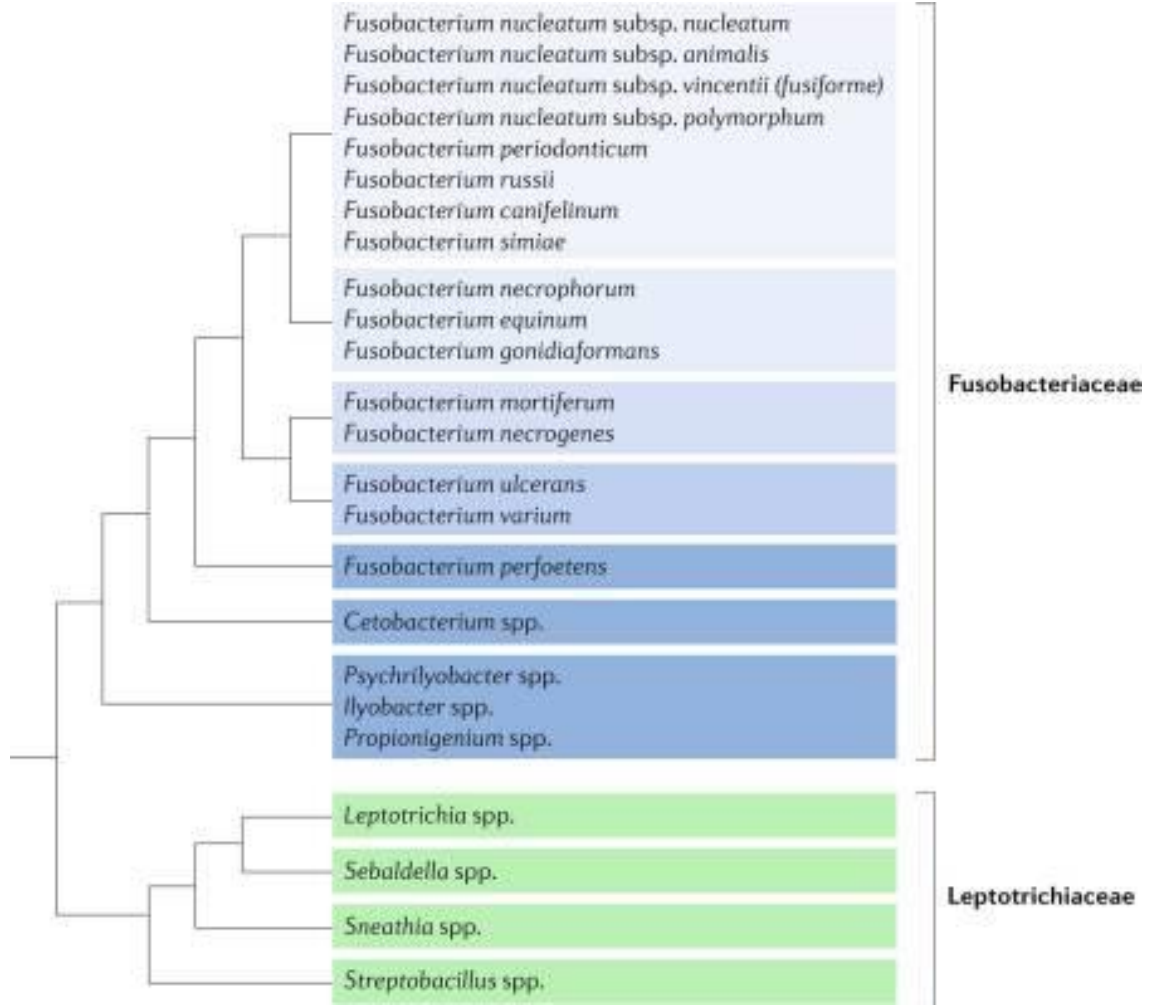
Yukarıda belirttiğimiz gibi anaerobik enfeksiyonlardan en sık izole edilen *Bacteroides* spp. *B. fragilis* ve *B. thetaiotaomicron*'dur. *B. fragilis*, normal insan fekal mikrobiyotasının sadece %4 ila %13'ünü oluşturmaya rağmen, *Bacteroides* enfeksiyonlarının %63 ila %80'inden izole edilir. *B. thetaiotaomicron* ise fekal mikrobiyotanın %15 ila %29'unu oluşturur, ancak enfeksiyon vakalarının sadece %13 ila %17'si ile bağlantılıdır (31). Bu, *B. fragilis*'in diğer ilgili *Bacteroides* spp.'den daha başarılı bir fırsatçı patojen olabileceğini gösterir. *Bacteroides* spp. üzerine yapılan güncel moleküler çalışmaların çoğu, *Bacteroides*'in fırsatçı patojenler olarak kendini göstermesine katkıda bulunan çok az virülans mekanizmaları arasında polisakkarit kullanım mekanizmalarına odaklanır. Hücre adezyonu, lipopolisakkarit üretimi ve nöraminidaz, enterotoksin ve proteolitik enzimlerin üretiminin *B. fragilis* patojenitesinde rol oynadığı öne sürülmüştür (32). *B. fragilis* ayrıca birkaç hemolizin üretme yeteneğine de sahiptir (33). Hemolizinler hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerde güçlü virülans belirleyicileri olarak tanımlanmıştır.

B. fragilis, konakçı ile etkileşimlerinde ikili rol oynayabilir. Toksik olmayan *B. fragilis* (NTBF) NCTC 9343 suşları, farelerde bağırsak iltihabını baskılayarak tolerojenik bir immün cevabı yönlendirir (34,35). Enterotoksijenik *B. fragilis* (ETBF) suşların ayırt edici bir özelliği, fragilizin adı verilen, aktif bölgesinde çinko (Zn⁺²) bulunduran metalloenzim yapısında bir enterotoksin – *B. fragilis* toksini (BFT) salgılamaktadır. ETBF kolonun iltihaplanmasına neden olur ve kolorektal kanser ile ilişkilidir (36, 37, 38, 39). BFT, mobilizasyon proteinlerini kodlayan genler (CTn86, bir konjugatif transpozon) tarafından çevrelenen *B. fragilis* patojenite adası adlı bir genom segmenti içinde kodlanır. Fragilizin etkisini, barsak epitel hücreleri arasında yer alan, bir tutundurucu bağlantı tipi olan zonula adherens'in ekstraselüler parçası E-kaderin'i parçalayarak göstermektedir. E-kaderin'in yıkılmasıyla hücre içi sinyal mekanizmaları devreye girmekte, çekirdekte c-Myc gibi birtakım onkojen proteinlerin ekspresyonu artmaktadır. Bu bağlamda, kolon kanseri oluşumunda fragilizin etkili olabileceği yönünde varsayımlar bulunmaktadır (40). ETBF hastalıkla ilişkili olmasına rağmen, bu suşların %30'a varan kısmı enfeksiyonu asemptomatik olarak yapar (38). Bu tutarsızlık,

konakçı duyarlılığının da rol oynayabilmesiyle birlikte, ETBF suşlarının patojenite açısından farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir (41). Patojenik potansiyeldeki farklılıklar, ETBF suşları arasında BFT üretimindeki varyasyona bağlanabilir. Normal durumda, bağırsak mikrobiyota-konak etkileşimleri, bağırsak bariyerinin istenen işlevleri nedeniyle dengelenir. Bağırsak epitel hücre bütünlüğü, sıkı bağlantı proteinleri ve mukus tabakası gibi birçok faktör, bağırsak mikrobiyota-konak etkileşimlerini kontrol eden uygun bağırsak bariyer fonksiyonlarını korur (42,43). Kommensal olmalarına rağmen *Bacteroides*, bağırsağın mukozal duvarının bütünlüğü tehlikeye girdiğinde veya ihlal edildiğinde tetiklenebilen fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilir ve genellikle abdominal apselere ve kan dolaşımı enfeksiyonlarına yol açar. Bağırsak bariyer fonksiyonunda böyle bir kayba neden olan durumlar arasında gastrointestinal cerrahi, perfore veya kangrenli apandisit, perfore ülser, divertikülit ve inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) yer alır. *B. fragilis*'te antibiyotiklere karşı ortaya çıkan direnç büyük bir endişe kaynağıdır. Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'daki büyük hastanelerdeki izolatlar arasında, klindamisin ve moksifloksasin için direnç oranları artık >%20 ila %30'dur. Şu anda, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'dan *B. fragilis* izolatları arasındaki karbapenem ve metronidazol direnç oranları genel olarak düşüktür (<%1 ila %2) (9, 44). Bununla birlikte, Tayvan (%7 ila %12), Almanya (%4,9 ila %5,3) ve Kanada'dan (%2,3 ila %12,7) araştırmacılar tarafından daha yüksek karbapenem direnç oranları bildirilmiştir. En ciddi olarak, karbapenemlere ve metronidazole aynı anda dirençli, çoklu ilaca dirençli *B. fragilis*'in nadir suşları da tanımlanmıştır (45,46).

2.3.1.2. *Fusobacterium*

Fusobacteria, daha önce üzerinde çalışılmamış taksonların başlıca örneğidir. Bu filum, insan ağız boşluğunda (*Fusobacterium* spp.), bağırsak ve ürogenital yollarında (sırasıyla *Leptotrichia* spp. ve *Sneathia* spp.), balıkların ve balinaların bağırsağında (*Cetobacterium* spp.) ve deniz ortamında yaygın olarak serbest yaşayan (*Ilyobacter* spp.) türleri içerir. Bu az çalışılmış bakteriler Gram negatif, spor oluşturmeyen, konik bir çubuk şeklinde, genellikle hareketsiz anaeroblardır. Nitramin patlayıcılarını parçaladığı gösterilen *Psychrilyobacter atlanticus* gibi benzersiz metabolik yeteneklere sahip olabilirler (47). *Fusobacteria* iki aileye ayrılmıştır: *Leptotrichiaceae* ve *Fusobacteriaceae*.



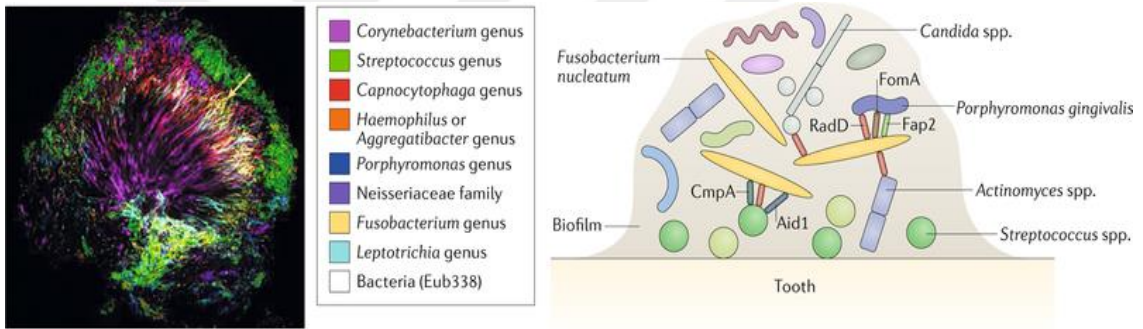
Şekil 1. *Fusobacterium*un sınıflandırılması (48)

Fusobacterium türleri, insanların ve fareler (*Fusobacterium mortiferum*), makak maymunları (*Fusobacterium simiae*), atlar (*Fusobacterium equinum*) ve hatta timsah kertenkeleleri (*Fusobacterium* spp.) dahil olmak üzere diğer hayvanların ağızlarında ve diğer mukoza bölgelerinde bulunur. Sağlıklı dokulardaki varlıkları, bu bölgelerdeki mikrobiyotanın doğal bileşenleri olduklarını göstermektedir. Bununla birlikte, aktif hastalık sırasında klinik örneklerde bu ve diğer dokulardan sıklıkla izole edildiklerinden fırsatçı patojenler olarak kabul edilirler. İnsanlarda kolonize olan *Fusobacterium* türlerinden *F. nucleatum* ağız boşluğunda en bol olanıdır ve ağız dışı hastalıklarla artan sayıda ilişki nedeniyle son on yılda bilimsel ilginin ön saflarında yer almıştır (49).

İki *Fusobacterium* türü, *F. nucleatum* ve *F. necrophorum*, bu cins içinde en sık izole edilen patojenlerdir (50). 1936'da Lemierre, orofaringeal infeksiyonu takiben

gelişen internal juguler ven trombozu, septik emboliler ve akciğer, karaciğer, kemik ve eklemlerde nekrotik apseler görülen vakalar (Lemierre sendromu) tanımladı (51). *F. necrophorum* bu sendroma sebep olan ajan olarak belirlendi. *F. necrophorum*'un sağlıklı genç yetişkinlerin orofarenksinde taşınması belgelenmiştir, ancak streptokokal olmayan tonsillitte de rol oynayabilir (52).

F. nucleatum, hem periodontal sağlığa hem de hastalığa katkıda bulunan biyofilmlerde ayrılmaz ve faydalı roller oynar. Bir dental plak biyofilminde, *F. nucleatum*, *Streptococcus* türleri gibi birincil kolonize edicileri, *Porphyromonas gingivalis* ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dahil olmak üzere, büyük ölçüde anaerobik ikincil kolonize edicilere bağlayan bir köprü organizması olarak destekleyici bir role hizmet eder (53).



Şekil 2. *Fusobacterium nucleatum*'un oral biyofilmlerdeki düzenleyici rolü (53)

Apandisit (54), beyin abseleri (55), osteomyelit (56), perikardit ve koryoamniyonit gibi olumsuz gebelik sonuçları dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda klinik örneklerden izole edilmiş olmasına rağmen, *F. nucleatum*'un bu patolojilerdeki rolü belirsizliğini koruyor. Bazıları *F. nucleatum*'un bu hastalık durumlarında bir hastalık sürücüsünden ziyade bir yolcu olduğunu öne sürdü (57). Bununla birlikte, *F. nucleatum*, enflamatuvar tepkileri destekleyebilir ve oral, kolonik ve plasental epitel hücreleri (58, 59), T hücreleri, keratinositler (60) ve makrofajlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerini bağlayabilir ve/veya istila edebilir.

Plasental enfeksiyonlar ve erken doğum gibi olumsuz gebelik sonuçları, *F. nucleatum*'un bir hastalık etkeni olarak rolünü destekleyen en fazla veriye sahip ağız

dışı hastalıklardır. *F. nucleatum*, erken doğumlarda amniyotik sıvıdan izole edilen en yaygın organizmadır ve ilgili hücre tipini (insan umbilikal endotel hücreleri) istila edebilir. Ayrıca, fare modellerini kullanan klinik öncesi çalışmalar, *F. nucleatum*'un plasentaya yerleşebileceğini ve intravenöz verildiğinde farelerde ölü doğumları indükleyebileceğini göstermiştir. Bu gözlemler göz önüne alındığında, *F. nucleatum* gerçek bir plasental patojen gibi görünmektedir; ancak *Fusobacterium* spp. sağlıklı plasental mikrobiyotanın bir parçası da olabilir (61).

2.3.1.3. *Prevotella*

Prevotella türleri, bağırsak (62), ağız boşluğu (63), solunum (64) ve üreme yolları (65) gibi çeşitli mukozal bölgelerdeki biyofilm topluluklarının ayrılmaz üyeleridir. Bu mikroorganizmalar konakçı sağlığında ikili rol oynayabilir ve etkileri sahaya özel olabilir. Bağırsakta, *Prevotella* bolluğu, yüksek lif tüketimi (66) ile pozitif olarak ilişkilendirilmiştir, ancak aynı zamanda obezite ve tip 2 diyabet için daha büyük risk (62) ile ilişkilendirilmiştir. Ağız boşluğunda *Prevotella* türleri, biyofilm oluşumunu kolaylaştırarak ve patojenik büyümeyi desteklemek için pH'ı nötralize ederek periodontitise katkıda bulunur (63).

Kadın üreme sisteminde *Prevotella* yaygın olarak bakteriyel vajinozlu (BV) kadınlardan izole edilir. Ayrıca, vajinada *Prevotella* bolluğu, obezite ve inflamasyon (67), cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların kapma riskinin artması (68,69), erken doğum ve erken membran rüptürü (70) ile ilişkilendirilmiştir.

Prevotella ve kronik inflamatuvar hastalık arasındaki ilk bağlantı, periodontal hastalıkta siyah pigmentli Gram negatif anaerobların gözlemlenmesiyle 1928 'te gösterildi. Gerçekten de, sonraki çalışmalar gingivitis ve periodontitis biyofilmelerinde *Prevotella*'nın varlığını doğrulamıştır.

Prevotella yalnızca belirli hastalık endotiplerinde rol oynayabilir ve nedensel ilişkileri belirlemek için daha büyük kohort çalışmalarına ihtiyaç vardır (71). Ek olarak, *Prevotella* inflamatuvar hastalığa katılan tek cins olmayabilir ve spesifik *Prevotella* türleri farklı özellikler sergileyebilir. Araştırmalar gösteriyor ki *Prevotella*, tür içi ve türler arası yüksek genetik çeşitliliğe sahip bir cinstir. Bu, *Prevotella*'nın sağlıklı mikrobiyotada neden bol olduğunu ve sadece belirli suşların patobiyotik özellikler sergileyebildiğini açıklayabilir (72,73).

2.3.1.4. Porphyromonas

Porphyromonas gingivalis, insan ağız boşluğunda dental plak biyofilmlerini kolonize eden gram negatif bir anaeroptur ve kronik periodontit gelişiminden sorumlu birkaç ana patojenden biridir. *P. gingivalis* patogenezi iyi anlaşılmıştır. Bu bakteriler gingipainler (proteinazlar), majör ve minör fimbrialar, hemagglutininler, hemolizin, demir alım taşıyıcıları, kapsül ve toksik dış zar kabarcıkları dahil olmak üzere çoklu virölans faktörlerine sahiptir(74). Bu bakteriler aynı zamanda başarılı biyofilm oluşturunuculardır, dental plakta bulunan diğer birçok türle birleşir ve koruyucu bir biyofilm ekzopolisakkarit matrisinin üretimine katkıda bulunur (75,76). *P. gingivalis*, dişeti epitel hücrelerine doğrudan bağlanır ve onları istila eder ve hücreden hücreye periodontal dokulara yayılabilir (77).

P. gingivalis ayrıca bakteriyemi yoluyla ağız boşluğunun ötesine yayılabilir. Ayrıca sistemik hastalıkların alevlenmesine katkıda bulunabilir (78, 79, 80, 81). *In vitro* ve klinik çalışmalar, *P. gingivalis*'in, plasental ve koroner arter endotelial hücreler gibi oral olmayan insan hücrelerini istila ettiğini ve bu hücrelerde hayatta kaldığını, lokalize inflamatuvar yanıtlara potansiyel olarak katkıda bulunabilecekleri göstermiştir (82, 83, 84).

2.3.1.5. Bilophila Wadsworthia

Bilophila wadsworthia gram negatif bir anaerobik basildir. Bu bakteri, son elektron alıcısı olarak taurini kullanarak bağırsakta fermentasyon gerçekleştirir. Üreaz pozitif, safraya dirençli, katalaz pozitifdir. Kapsülsüzdür ve büyüme substratı olarak hidrojeni kullanır (85).

B. wadsworthia, sağlıklı insanların kolon mikrobiyotasında düşük miktarda bulunmasına rağmen (86), apandisit ve kemik, beyin, karaciğer ve kulak apseleri, ayrıca kolorektal kanser (87) ile ilişkilendirilmiştir. Farelerde, *B. wadsworthia*, sistemik enflamasyona neden olabilir (88) ve *taurinle* konjuge safra asitleri gastrointestinal sistemde daha bol olduğunda ülseratif kolitin başlamasıyla eş zamanlı olarak çoğalır (89).

2.3.2. Anaerob Koklar

2.3.2.1. Gram Pozitif Koklar

Gram pozitif anaerob koklar (GPAK), kommensal mikrobiyotanın önemli bir kısmını oluşturur. Günümüzde tanımlanmış GPAK'lara ait 13 cins (*Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Finegoldia*, *Parvimonas*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Gallicola*, *Murdochella*, *Atopobium*, *Anaerosphaera*, *Coprococcus*, *Sarcina*, *Blautia*) bulunmaktadır. GPAK'lar deri veya mukoza bütünlüğünün bozulduğu durumlarda steril vücut bölgelerine ulaşarak endojen kaynaklı enfeksiyonlara yol açabilir. Klinik örneklerden izole edilen anaerob bakterilerin yaklaşık %25-30'unu oluştururlar. Sıklıkla enfeksiyona yol açmalarına karşın literatürde GPAK'larla ilgili çalışmalar sınırlıdır (90).

GPAK'lar oksijene son derece duyarlı mikroorganizmalardır. Bu nedenle gerek klinik örneklerin alınması ve taşınmasında, gerekse üretilmelerinde özel anaerob koşulların sağlanması gereklidir. Ancak tanı laboratuvarlarının birçoğunda anaerob taşıma sistemi ve anaerob bakterilerin üretilmesi için anaerob ortam bulunmamaktadır. Ayrıca bu mikroorganizmaların üremelerinin yavaş olması ve tanımlanmalarında kullanılan fenotipik yöntemlerin uzun zaman alması GPAK'larla ilgili çalışmaların kısıtlı olmasında önemli etkindir. Diğer yandan, GPAK'lar genellikle diğer mikroorganizmalarla beraber mikst enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Mikst kültür ortamında hızlı üreyen ve daha büyük koloni oluşturan bakterilerin arasında küçük kolonilere sahip GPAK'ların gözden kaçması da diğer bir sınırlayıcı etkindir (91, 92).

Sınırlı sayıda çalışma yapılmış olsa da, dünya genelinde sıklıkla izole edilen GPAK'ların bazı antibiyotiklere önemli oranda direnç geliştirdikleri saptanmıştır. Direnç oranları, coğrafi bölgelere, merkezlere, hatta aynı merkezde bulunan farklı servislere göre ve enfeksiyon türlerine göre farklılıklar göstermektedir. GPAK'ların türler arasında da antimikrobiyal direnç oranları bakımından farklılıklar sergiledikleri tespit edilmiştir (93,94). Yapılan çalışmalarda, GPAK enfeksiyonlarına neden olan izolatlar çoğunlukla tür ayırımına gitmeksizin ele alınmış ya da çok az sayıda tür tayini yapılmıştır (93, 94). Diğer yandan, GPAK'larda son zamanlarda halen devam etmekte olan büyük taksonomik değişiklikler yapılmıştır (95). Taksonomiye yeni katılan izolatların antibiyotiklere direnç profili ise henüz bilinmemektedir. GPAK izolatlarının

tür düzeyinde antimikrobiyal duyarlılık paternlerin saptanması gerekli olup bu durum etkili bir ampirik tedavi açısından çok önemlidir.

2.3.2.2. Gram Negatif Koklar

Veillonella spp., insan mikrobiyomunda bol miktarda bulunur ve insan ve hayvanların ağız, solunum yolları, bağırsak ve genitoüriner sistem florasında bulunur (96). *Veillonella* spp.'nin önemi, insan enfeksiyonlarında belirsizdir ve genellikle düşük virülanslı oldukları kabul edilir (97).

Oral biyofilm mikrobiyotası arasında, *Veillonella* türlerinin bol olduğu bilinmektedir; özellikle dil yüzeyinde, yanak mukozasında ve diş yüzeylerinde sıklıkla tespit edilirler ve ayrıca çocuklarda ciddi diş çürüklerinde (erken çocukluk çürüklerinde) etkindir (98). *Veillonella atypica*, *V. dispar*, *V. rogosae*, *V. tobetsuensis*, *V. parvula* ve *V. denticariosi* dahil olmak üzere birçok *Veillonella* türü, çocukların ve sağlıklı genç yetişkinlerin ağız boşluklarında tespit edilmiştir (98, 99). *Veillonella* türleri, karbon ve enerji kaynağı olarak laktik asidi kullanır ve onu asetik, propiyonik ve formik asit gibi daha zayıf asitlere dönüştürür. Yukarıda bahsedildiği gibi, diş çürüğü, *Streptococcus mutans* gibi asidojenik bakteriler tarafından üretilen asitler tarafından başlatılırken, laktik asidin daha zayıf asitlere dönüştürülmesi gibi asit nötralizasyonu, diş yüzeylerinin demineralizasyonuna karşı koymaya katkıda bulunabilir ve bunların remineralizasyonunu teşvik edebilir (100). Bu sebeple *Veillonella* türlerinin diş çürüklerini önlemede faydalı bakteri türleri olduğu varsayılmaktadır.

Veillonella türleri laktik asit kullanmanın yanı sıra nitratı (NO_3^-) indirgeyerek nitrit (NO_2^-) üretme yeteneğine de sahiptir (101). Nitrat ıspanak, marul ve lahana gibi yeşil yapraklı sebzelerden elde edilebilir (102). Gastrointestinal sistemden emildikten sonra, alınan NO_3^- 'ün yaklaşık %25'i tükürükte salgılanır (103). Bu nedenle NO_3^- her zaman ağız boşluğunda bulunur ve bir kısmı *Veillonella* türleri tarafından NO_2^- 'ye indirgenir. Nitrit antimikrobiyal aktivite sergiler ve bu nedenle gıda muhafazasında yaygın olarak kullanılır. Dental alanda, NO_2^- 'nin diş plağının asit üretimini (104) ve ayrıca *Streptococcus mutans* ve *Porphyromonas gingivalis* gibi oral patojenik bakterilerin büyümesini engellediği bildirilmektedir. Bu nedenle, *Veillonella* türleri tarafından üretilen NO_2^- diş çürükleri gibi ağız hastalıklarının önlenmesine katkıda

bulunabilir. Ayrıca NO_2^- 'nin kan basıncını normalleştirerek genel sağlığa katkıda bulunduğu bilinmektedir (105). Ağız boşluğunda üretilen NO_2^- dolaşıma girer ve nitrit redüktaz tarafından veya midede bulunan asidik ortam tarafından enzimatik olmayan bir şekilde nitrik okside (NO) dönüştürülür, bu da vazodilatasyona ve kan basıncında önemli bir azalmaya neden olur (106,107).

2.3.3. Gram Pozitif Basiller

2.3.3.1. Sporsuz Gram Pozitif Basiller

2.3.3.1.1. *Actinomyces*

Cinsin adı yunanca aktinos (ışın) ve myces (mantar) kelimelerinden gelmektedir. Bu, bakteriyel filamentlerin (hifaya benzeyen) radyal dizilimi ve filamentli mantarlar için tipik olan reproduktif aseksüel sporlara sahip olma özelliklerine karşılık gelir (108). İlgili suşların çoğu aerotolerant (*Actinomyces meyeri* ve *A. israeli*'nin her ikisi de zorunlu anaerobiktir), saprofitik, spor oluşturmeyen dallanan, ipliksi, gram pozitif çubuklardır (109, 110,111).

Aktinomikozun insan veya hayvan kaynaklı endojen bir enfeksiyon olduğu günümüzde iyi bilinmektedir (112). *Actinomyces*, insan ve hayvan organizmasının farklı bölgelerinde sık kolonileşebilir (113). *Actinomyces* spp., ağırlıklı olarak insan ağız boşluğunda bulunur. Bu organizmalar ağızın yanı sıra farklı anatomik bölgelerde de bulunabilir; üst solunum yolu, gastrointestinal sistem, kadın genitoüriner sistem ve çok nadiren deride kolonize olabilir (113, 114). Diğer bakteriler (cilt florasının normal üyeleri olan) tarafından çeşitli inhibitör moleküllerin (yağ asitleri, antibakteriyel peptitler) salgılanması nedeniyle cilt yüzeyinde nadiren bulunurlar. Mukozal bariyer travma, cerrahi prosedürler veya yabancı cisimler varlığında bozulursa, burada yerleşen *Actinomyces* türleri daha derin dokulara invaze olur ve dokularda filamentli basil kümelerinden oluşan kitleler oluşturur (115). Patojenik *Actinomyces* suşlarının enfeksiyonlara neden olan virülans faktörleri hakkında çok az bilgi vardır. *Actinomyces* spp. enfeksiyonlarının çoğu polimikrobiyaldir ve *Streptococcus* cinsinin üyeleri en sık ilişkili mikroorganizmalardır (116). Konak savunma mekanizmalarını inhibe ederek ve etkilenen dokudaki oksijen gerilimini azaltarak sinerjik olarak hareket ederler, bu da *Actinomyces* spp.'nin büyümesini artırır.

Actinomyces türlerinin ağız boşluğunda biyofilm oluşumunda nasıl bir rol oynayabileceğine dair bazı kanıtlar bildirilmiştir (117). Oral mikrobiyota üyelerinin üreaz enzimleri tarafından ürenin hidrolizi, oral mikrobiyal ekoloji üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilir. Ağız boşluğu ve kadın genital sistemi gibi birçok anatomik bölgede, aşırı karbonhidrat mevcudiyeti ve nötr pH ortamları, biyofilmlerde *Actinomyces*'in üreaz ekspresyonunu teşvik edebilir. Yalnızca nötr pH ortamları ure C gen ekspresyonunu up-regüle edebilir (pH, transkripsiyonel düzeyde ure C'yi gen ekspresyonu düzenler) (118). *Actinomyces* suşlarının çoğu, dekstran, levan, glikojen ve N-asetilglukozamin gibi polisakkaritler bakımından zengin hücre içi/hücre dışı polimerler üretebilir, bu nedenle hücreler farklı (kendi veya yabancı) yüzeylere bağlanabilir. Ayrıca *Actinomyces* spp. patojenitelerinde rol oynayan farklı fimbrialara sahiptir: tip 1 fimbria bakterinin tükürükte bulunan prolinden zengin proteinlere yapışmasına yardımcı olurken, tip 2 fimbria, oral biyofilmlerin gelişimi sırasında *Actinomyces* ve Streptokoklar veya konak hücreler arasındaki reseptöre bağlı pıhtılaşmaya aracılık eder (116, 119).

Kadın genitoüriner yolunun Aktinomikoz enfeksiyonları nispeten nadirdir (Batı popülasyonlarında, tahmini prevalansı 1/300.000 kişidir) (109, 110, 120). Bununla birlikte, kadın genitoüriner yolunun aktinomikozu, Aktinomikozisin ikinci en sık görülen klinik belirtisidir (121). Genitoüriner sistem aktinomikozunun en yaygın şekli, intrauterin kontraseptif araç (RİA) kullanan genç, doğurgan kadınlarda pelvik aktinomikozdur, ancak günümüzde modern mikrobiyolojik teknikler geliştiğine göre, primer mesane aktinomikozu ve testiküler aktinomikoz gibi bazı başka klinik sunumlar da tanımlanmıştır (122).

2.3.3.1.2. *Propionibacterium*

Propionibacterium cinsi ilk olarak 1909'da Orla-Jensen tarafından tanımlanmıştır. Fermantasyon işlemi sırasında propiyonik asit üreten türlerden oluşur (123). *Propionibacterium* cinsi *Propionibacteriales* (124) takımının *Actinobacteria* sınıfına aittir. “Akne vulgaris” adı verilen kronik bir cilt hastalığı olan bir hastada keşfedilmesinin ardından, sonradan *Cutibacterium acnes* olarak adlandırılan *Propionibacterium acnes*, bir dizi taksonomik değişiklik geçirmiştir. Sırayla *Bacillus* cinsine ve *Corynebacterium* cinsine yerleştirildi. Bununla birlikte, 1946'da Douglas ve

Gunter, bu mikroorganizmanın *Propionibacterium* cinsi üyeleriyle daha yakından ilişkili olduğunu gösterebildi, çünkü bu cinsin diğer türleri gibi, anaerobik bir atmosferde laktozu propiyonik aside fermente etmektedir (125). Son zamanlarda, Scholz ve Kilian tarafından deri mikrobiyotasındaki tüm *Propionibacterium* türlerini yeni bir cins içine yerleştirerek önemli bir taksonomik revizyon önerilmiştir (126). Sonuç olarak, *P. avidum*, *P. acnes*, *P. granulosum* ve daha yeni keşfedilen *P. namnetense* (127) ve *P. humerusii* (128) türleri için *Propionibacterium* isminin yerini *Cutibacterium* almıştır.

Propionibakteriler, deri yüzeyindeki toplam bakteri popülasyonunun %2'den azını oluşturur (129). *P. acne/C. acne* ayrıca mide, bağırsak, akciğer, ağız, konjonktiva, prostat ve idrar yolu gibi diğer dokularda da bulunur (130). Sebasöz bölgelerde baskın olarak bulunan *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), cilt homeostazının düzenlenmesinde kritik öneme sahipken (131) aynı zamanda diğer zararlı patojenlerin kolonizasyonu önler (129,132). Ayrıca akne vulgaris'te fırsatçı bir patojen olarak da hareket edebilir. *P. acnes* ile ilgili yeni bulgular daha önce düşünülenin aksine, çoğalmasının aknenin tetikleyicisi olmadığını, bunun yerine cilt florası üyeleri ve *P. acnes* filotipleri arasındaki sıkı dengenin akne başlangıcında daha kritik bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır (132, 133). Mikrobiyal çeşitliliğin kaybı kronik inflamatuvar deri hastalıklarına yol açabilir (133,134).

2.3.3.1.3. *Bifidobacterium*

Bifidobakteriler, insanda gastrointestinal sistemde ve vajinada yaygın olarak bulunan spor oluşturmeyen gram pozitif anaerobik basillerdir. *Bifidobacterium* cinsi, 50'den fazla türden oluşur, bunlardan 10'u sadece insanlarda bulunmuştur. Anne sütü ile beslenen bebeklerde, bifidobakteriler bağırsak mikrobiyotasının %80'inden fazlasını oluştururken, yetişkin dışkı florasının sadece %3 ila %6'sını oluşturur (135,136). Ayrıca, tür dağılımı bebeklerde ve yetişkinlerde farklıdır; *Bifidobacterium adolescentis* ve *Bifidobacterium longum subsp. longum*, yetişkin bağırsak florasındaki başlıca bifidobakteri türleridir ve *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ve *Bifidobacterium breve*, insan bebeklerinin bağırsak yolundaki baskın türlerdir (137,138). *Bifidobacterium* cinsinin seçilmiş üyelerinin, patojenlerin dışlanması (139), bağışıklık sisteminin modülasyonu (140,141) ve diyetten türetilen karbonhidratların parçalanması

(142) dahil olmak üzere konakçıya sağlık yararları sağladığına inanılmaktadır. Bu etkilere dayanarak, kanıtlar yetersiz olsa da bifidobakteriler genellikle probiyotik ürünlere, diğer laktik asit bakterileri ile kombinasyon halinde, hastalıkları önlemek veya tedavi etmek için eklenir (143,144).

Bifidobacterium'un patojenik potansiyeli belirsizliğini koruyor. İnvaziv enfeksiyonların insidansına ilişkin veriler çok sınırlıdır, ancak *Bifidobacterium* türlerinin anaerobik kan kültürü izolatlarının %0,5 ila 3'ünü temsil ettiği tahmin edilmektedir (145).

Erişkinler arasında 2015 yılına kadar literatürde sadece 15 *Bifidobacterium* bakteriyemi vakası rapor edilmişti (146) ve bunların çoğu altta yatan gastrointestinal hastalığı ve/veya bağışıklığı zayıflamış hastalardı. *Bifidobacterium* bakteriyemisi olan hastaların klinik görünüşleri, prognostik faktörleri ve sonuçları hakkında çok az veri bulunmaktadır.

2.3.3.1.4. *Eubacterium*

Eubacterium gram pozitif, spor oluşturmayan, zorunlu anaerobik basillerdir. *Eubacterium* türleri gastrointestinal sistemin normal flora üyeleridir. Aynı zamanda intraabdominal enfeksiyonlar ve bakteriyemiye neden olabilir. Gastrointestinal sistem, kadın genital sistemi, ağız boşluğu ve prostat dahil olmak üzere çeşitli insan bölgelerinden izole edilmiştir (147).

2.3.3.2. Sporlu Gram Pozitif Basiller

2.3.3.2.1. *Clostridium Difficile*

Clostridium difficile (*C. difficile*), 2016 yılında resmi olarak *Clostridioides difficile* olarak yeniden adlandırılan, anaerobik, spor oluşturan, toksin üreten gram pozitif bir basildir. Yeni isim, bu tür ile *Clostridium* cinsinin diğer üyeleri arasındaki taksonomik farklılıkları yansıtmaktadır (148). *C. difficile* sporları fekal-oral yolla bulaşır ve çevrede yaygın olarak bulunur. *C. difficile* için potansiyel rezervuarlar asemptomatik taşıyıcıları, enfekte hastaları, kontamine çevreyi ve hayvan bağırsak sistemini (köpek, kedi, domuz, kuş) içerir. Yetişkinlerin yaklaşık %5'i ve bebeklerin %15-70'i *C. difficile* tarafından kolonize edilir ve kolonizasyon prevalansı hastanede yatan hastalarda veya huzurevinde kalanlarda birkaç kat daha yüksektir (149).

Clostridium difficile enfeksiyonu (CDİ) için önemli risk faktörleri antibiyotik maruziyeti, ileri yaş ve hastaneye yatıştır. CDİ tedavisinde kullanılan ilaçlar: metronidazol ve vankomisin dahil olmak üzere hemen hemen her antibiyotik CDİ gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Geniş spektrumlu penisilinler ve sefalosporinler, klindamisin ve florokinolonlar, diğer antibiyotiklerden daha yüksek CDİ indüksiyon riskine sahiptir. *C. difficile*, hastane kaynaklı ishalin en yaygın nedenidir (150).

CDİ için iyi tanımlanmış diğer risk faktörleri arasında inflamatuvar barsak hastalığı, gastrointestinal cerrahiler ve malign neoplazmlar, transplantasyonlar, kronik böbrek hastalıkları veya immünosupresan kullanımının neden olduğu immünolojik yetersizlik yer alır (149, 151).

C. difficile ile enfeksiyon çoğunlukla spor bulaşmasının bir sonucu olarak ortaya çıkar. *C. difficile* sporları çevrede birkaç ay hayatta kalır (152). Tuvaletler, klinik mobilyaları, telefonlar ve tıbbi cihazların (termometreler, stetoskoplar) tümü *C. difficile* sporları için rezervuar görevi görebilir. Sporlar, sağlık personelinin elleriyle hastalara aktarılabilmektedir. Bu nedenle, Johnson ve ark. tarafından gösterildiği gibi, sabun ve su ile iyi el hijyeni ve düzenli vinil eldiven kullanımı bulaşmayı durdurmak için çok önemlidir. Sporlar ısıya, aside ve antibiyotiklere karşı dirençlidir. CDİ'ye karşı ana koruyucu bariyer, normal bağırsak mikroflorasıdır. Bağırsaklara ulaştıktan sonra, safra asitleri *C. difficile* sporlarının aktivasyonunda önemli bir rol oynar (153). Patojen invaziv değildir ve virülans çoğunlukla kollajenaz, hiyalüronidaz, kondroitin-sülfataz gibi enzimlerin yanı sıra epitel hücre hücre iskeletine zarar veren, sıkı bağlantıların bozulmasına, sıvı salgılanmasına, nötrofil yapışmasına neden olan toksinlerden kaynaklanır. Sonuç, bağırsak bariyeri bütünlüğünün bozulması ve işlevsellik kaybıdır (154,155). *C. difficile*, hem enterotoksik hem de sitotoksik olan A ve B toksinlerini üretir; ancak geleneksel olarak toksin A "enterotoksin A" ve toksin B, "sitotoksin B" olarak adlandırılır. *C. difficile* transferaz (CDT veya ikili toksin), epidemik PCR ribotipleri 027 dahil olmak üzere bazı *C. difficile* suşları tarafından üretilen üçüncü bir toksindir. CDT epitel hücreleri üzerinde mikrotübül bazlı çıkıntılar oluşturur, bu da, muhtemelen, klinik bir etkiye sahiptir. TcdA⁻ TcdB⁻ CDT⁺ türünün neden olduğu ciddi CDİ gelişimi raporları vardır (156). Enterotoksin, nötofiller için kemotaktik özellikte olup, polimorfonukleer nötrofillerin ileuma infiltrasyonunu ve sitokin salgılamalarını stimüle eder. Toksin A ayrıca, sitopatik etki oluşturmaktadır; bu etki,

hücreler arası sıkı bağlantıların bozulmasına, bağırsak duvarında geçirgenliğin artmasına ve sonuçta diyarenin oluşmasına yol açar. Sitotoksin ise hücre iskeletinin yıkımı ile sonuçlanan aktin depolimerizasyonuna neden olmaktadır. Her iki toksin de bağımsız olarak CDİ semptomlarını ortaya çıkarabilir (157).

CDİ'nin klinik tablosu çok heterojendir ve asemptomatik taşıyıcılık durumundan, hafif veya orta dereceli diyareden hayatı tehdit eden fulminan kolite kadar değişir. CDİ kolonun her bölümünü etkileyebilir, ancak en yaygın olarak distal segment infiltre olur. CDİ'li hastaların çoğu hafif ishalden muzdariptir ve antibiyotik tedavisinin kesilmesinden sonra kendiliğinden iyileşme yaşar. CDİ'nin klinik özellikleri sulu ishale ek olarak karın ağrısı, ateş, bulantı, kusma, halsizlik ve iştahsızlıktır. Aktif kanama nadiren mevcut olmasına rağmen, dışkıda gizli kan testi genellikle pozitifdir. CDİ'nin en şiddetli klinik sunumunda, semptomlar yaşamı tehdit eder ve önemli dehidratasyon, abdominal distansiyon, periferik ödemli hipoalbuminemi ve ardından hipovolemik şok görülür. CDİ'nin diğer ciddi komplikasyonları arasında toksik megakolon, kolon perforasyonu, bağırsak felci, böbrek yetmezliği, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu, sepsisemi ve ölüm yer alır.

Tedaviye sadece CDİ semptomları olan hastalarda başlanmalıdır; enfeksiyon belirtileri olmadan *C. difficile* toksininin varlığı tedavi için bir gösterge değildir. 2014 yılında, metronidazol ve vankomisin adlı iki ilacın CDİ tedavisinin temel taşı olduğu ESCMID kılavuzları yayınlandı. Şiddetli olmayan CDİ'de metronidazol birinci basamak ilaç iken, şiddetli CDİ için vankomisin tercih edilen ilaçtı (158). 2017'de Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) ve Amerika Sağlık Hizmetleri Epidemiyolojisi Derneği (SHEA) kılavuzlarını güncelleyerek vankomisin ve fidaksomisin CDİ tedavisinin temel taşı olduğuna işaret etti (159).

2.3.3.2.2. *Clostridium Perfringens*

Clostridium perfringens ilk olarak 1891 yılında Johns Hopkins Hastanesi'nde 38 yaşındaki bir erkek üzerinde yapılan otopsi sonrasında MD William H. Welch tarafından keşfedildi ve başlangıçta *Bacillus aerogenes capsulatus* olarak adlandırıldı (160). Daha sonra, *Bacillus welchii* olarak biliniyordu, nihayet Latince'den "patlama"(burst through) anlamına gelen *Clostridium perfringens* olarak yeniden adlandırıldı.

Sınıflandırma, altı ana toksinin üretimine dayanmaktadır: alpha-toxin (CPA), beta-toxin (CPB), epsilon-toxin (ETX), iota-toxin (ITX), enterotoxin (CPE), and necrotic enteritis B-like toxin (NetB) (161).

- TipA: Yalnızca CPA
- TipB: CPA, CPB, ETX
- TipC: CPA, CPB, CPE (+/-)
- TipD: CPA, ETX, CPE (+/-)
- TipE: CPA, ITX, CPE (+/-)
- TipF: CPA, CPE
- TipG: CPA, NetB

Tip A ve Tip C'nin insan hastalığına neden olduğu bilinmektedir. Tip A, *C. perfringens* ile ilişkili gıda zehirlenmelerinin ve gıda kaynaklı olmayan ishal hastalığının çoğundan sorumludur. Gıda kaynaklı hastalık salgınları için CDC epidemiyoloji gözetim verilerine göre, *C. perfringens* salgınların %5'ini, hastalıkların %10'unu ve hastaneye yatışların %4'ünü oluşturmaktadır (162).

C. perfringens'in patofizyolojisi, toksin aracılı doku nekrozu yoluyla. Toksin, epitel hücrelerde porlar oluşturur, membran geçirgenliğini değiştirerek sıvı ve iyon kaybına neden olur. *C. perfringens* enfeksiyonunun ayırt edici özelliği, glikoz fermantasyonu yoluyla histotoksik gaz üretimidir.

C. perfringens tarafından üretilen toksinler:

- CPA, hücre zarında fosfatidilkolin ve sfingomiyelini parçalayabilen, nötrofillerin hem göçünü hem de olgunlaşmasını engelleyebilen ve vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonuna yol açan araşidonik asit metabolizmasını aktive edebilen bir enzimdir. Sonuç olarak, bu toksin, zayıf doku sirkülasyonu ve doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin bozulması ile bir mikro-ortam oluşturur (163).

- CPB, endotel hücrelerine bağlandığı ve P maddesinin salınımı yoluyla nörotoksik özelliklere sahip olduğu bilinen por oluşturucu bir toksindir. Ayrıca toksinin nekrotizan enterokolit patogenezinde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (164).

- CPE, por oluşturucu bir toksindir. Hücre yüzeyindeki claudin reseptörlerine bağlanır ve kalsiyum akışına izin veren bir heksamer kompleksi oluşturur. Bu toksin,

gıda zehirlenmesine ve gıda kaynaklı olmayan ishale neden olan başlıca suçludur. Kalsiyum akışı doza bağımlıdır ve kalpainin aktivasyonuna ve nihayetinde hücre ölümüne yol açar (161).

- ETX, koyunlarda hemorajik enterit ve enterotoksemi ile ilişkilidir. Toksin, enterik proteazlar tarafından aktive edilir ve sıkı bağlantıların ve lamina proprianın bozulması yoluyla bağırsak geçirgenliğini artırır (165).

- ITX, iki farklı protein Ia ve Ib olarak üretilen ikili bir toksindir. Ib, bir hücre yüzeyi reseptörüne bağlanır ve Ia ile birleşir. Kompleks daha sonra endositoza tabi tutulur. Ia, Ib tarafından oluşturulan bir zar kanalı yoluyla sitozole geçecek ve daha sonra ADP-ribozilasyon yoluyla aktin hücre iskeletini depolimerize etmeye devam edecektir (166).

- NetB, CPB ile %38 dizi benzerliğine sahip olduğu gösterilen kuş nekrotik enteritinde tanımlanan gözenek oluşturucu bir toksindir. Keşfi ile G tipi sınıflandırma oluşturulmuştur, ancak insanlarda patojenite ile bağlantılı değildir (167).

- Perfringolizin O (PFO), CPA ile sinerjik etkilere sahip olduğu gösterilen ve gazlı kangren patogeneğinde yer alan por oluşturucu bir toksindir. Eritrositleri hedef aldığı ve pıhtılaşma nekrozuna neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca bu toksin, *Streptococcus*, *Bacillus* ve *Listeria*'da bulunan diğer por oluşturucu toksinlerle benzerdir (168).

Öykü ve fizik muayene, gıda zehirlenmesi ve gıda kaynaklı olmayan ishal hastalığında, etkenin belirlenmesine ve bir ayırım yaratılmasına yardımcı olabilir. Semptomlar tipik olarak çiğ veya az pişmiş et veya kümes hayvanlarının tüketilmesinden 8-16 saat sonra başlar. Hastada sıklıkla yaygın karın ağrısı, bol sulu, kanlı olmayan ishal ve kusma bir arada olacaktır.

Clostridial miyonekroz (gazlı kangren) tipik olarak bir yaralanmadan sonra (travmatik) ortaya çıkar, ancak iskemik vasküler hastalığı veya diyabeti (travmatik olmayan) olan hastalarda kendiliğinden gelişebilir. Hastalar enfeksiyon bölgesinde selülit, ateş ve titreme ile başvururlar. Yarada ödem, hassasiyet ve küf kokulu akıntısı olan büller vardır. Sonra derin dokuların enfeksiyonu, deri altı yağ, kas veya sinirlerin nekrozu gelişir. Semptomlar hızla septik şoka, yaygın damar içi pıhtılaşmaya ve çok yüksek mortalite ile ilişkili akut solunum sıkıntısı sendromuna ilerleyebilir (169,170).

Çoğu *C. perfringens* ile ilişkili akut diyare hastalığı kendi kendini sınırladığı için, övolemik bir durumu sürdürmek için yalnızca destekleyici tedaviye ihtiyaç vardır. Antibiyotikler genellikle endike değildir. Bunun istisnası, tıbbi bir acil durum olan klostridiyal sepsistir. Klostridiyal sepsis sıklıkla septik şokta, eritrositlerin CPA aracılı yıkımına bağlı olası intravasküler hemoliz ile kendini gösterir. Bu durumda, penisilin G ve klindamisin, tetrasiklin veya metronidazol ile birlikte nekrotik dokunun cerrahi debridmanı ile erken antibiyotik tedavisi ölümün önlenmesine yardımcı olabilir (171). Bu hastalar, kaynak kontrolü sağlanmadıkça muhtemelen tıbbi tedaviye dirençli olacaktır.

Klostridial miyonekroz şüphesi cerrahi konsültasyonu gerektirir. Konsültasyon, laboratuvar veya görüntüleme sonuçları beklenerek geciktirilmemelidir. Geniş spektrumlu antibiyotikler derhal uygulanmalıdır. Ek olarak, hiperbarik oksijenin ciddi enfeksiyon vakalarında sonuçları iyileştirdiği gösterilmiştir.

2.3.3.2.3. *Clostridium Botulinum*

Clostridium botulinum anaerobik spor oluşturan bakterilerdir. *C. botulinum* ölümcül botulinum nörotoksini oluşturan tehlikeli bir patojendir. Bu bilinen en güçlü toksindir, 30-100 ng kadar az miktarı ölümcül olabilir (172). Sekiz farklı botulinum nörotoksin tipi (tip A - H) ve otuzdan fazla farklı nörotoksin alt tipi (örn. A1 ila A5 alt tipleri) tanınır (173,174). Botulinum nörotoksinleri, kolinerjik sinirlerde asetilkolin iletimini bloke ederek, botulizm olarak bilinen ve hem insanlar hem de hayvanlar için ölümcül olabilen gevşek felce yol açan çinko-endopeptidaz aktivitesine sahip 150 kD proteinlerdir (175). En sık bildirilen insan botulizmi türleri, gıda kaynaklı botulizm, bebek botulizmi ve yara botulizmidir (172, 176). Gıda kaynaklı botulizm, gıdalarda *C. botulinum* tarafından oluşturulan spor çimlenmesi ve vejetatif hücrelerin büyümesini takiben nörotoksin tüketiminin neden olduğu bir intoksikasyondur. Bebek ve yara botulizmi, sırasıyla bebeklerin bağırsaklarında ve derin yaralarda (genellikle uyuşturucu kullanımıyla ilişkili) spor çimlenmesini, vejetatif hücrelerin büyümesini ve nörotoksin oluşumunu içeren enfeksiyonlardır. Botulinum nörotoksinleri ayrıca bir dizi lokalize durumu, örneğin, blefarospazm, hemifasiyal spazmı tedavi etmek için ve kozmetik amaçlı kullanılan önemli farmasötik maddelerdir (177).

C. botulinum, botulinum nörotoksini oluşturma gibi ortak özelliğini paylaşan dört farklı bakteri grubunun kompleksini içeren heterojen bir türdür (178). Grup I (proteolitik) *C. botulinum*, gıda kaynaklı botulizm, bebek botulizmi ve yara botulizmi ile ilişkilidir ve A, B, F veya H tiplerinden bir veya daha fazla nörotoksin oluşturur (174, 178). Tip A1 nörotoksini oluşturan Grup I *C. botulinum* suşları, genellikle insanlarda botulizme neden oldukları, tip A1 nörotoksininin aşırı güçlü olduğu ve bir farmasötik olarak kullanıldığı için bugüne kadar en fazla ilgiyi çekmiştir (172, 179, 180, 181). Grup I *C. botulinum*'un spor oluşturma bu bakterilerin önemli bir gıda güvenliği ve gıda bozulma sorunu oluşturma birincil nedenidir. Grup I *C. botulinum* suşları, belirgin bir şekilde, çok yüksek ısı direncine sahip sporlar oluşturur (172). Uygun koşullar altında bakteri sporlarının uyku hali bozulur ve çimlenme meydana gelir. Bu genellikle, besin miktarının artmasına yanıt veren sporun iç zarında bulunan bir germinant reseptör (GR) tarafından başlatılır ve bunu dipikolinik asit salınımı ve kısmi çekirdek hidrasyonu izler. Daha sonra, korteks litik enzimler, spor korteksindeki peptidoglikanı bozarak, daha fazla çekirdek hidrasyonu ve büyümesini sağlar ve bu, spor direncinin kaybıyla sonuçlanır (182). Çimlenmiş sporlar, uyku halindeki sporda bulunan önceden oluşturulmuş enzimleri içerir, metabolizmanın ve makromoleküler sentezin başlatılması, çoğalabilen bir hücrenin ortaya çıkmasına neden olur. On yıllardır mikrobiyologları ilgilendiren bir yaklaşım, ya spor çimlenmesini tamamen önlemek ve böylece sonraki çoğalmayı önlemek ya da tüm sporları çimlendirmek ve sonra ortaya çıkan hassas vejetatif hücreleri etkisiz hale getirmek için stratejiler geliştirmektir. Ne yazık ki, spor çimlenmesinin oldukça heterojen doğası uygun stratejilerin gelişmesini engellemiştir (183, 184, 185).

2.3.3.2.4. *Clostridium Tetani*

C. tetani, zorunlu anaerobik, saprofitik, gram pozitif bakteridir. Çevreden elimine edilemeyen ve hem iç hem de dış ortamlarda aşırı sıcaklık koşullarına dayanabilen spor oluşturan bir organizmadır. Tetanoz sporlarının çevrede uzun yıllar yaşayabildiği ve çoğu zaman ısıya ve dezenfektanlara karşı dirençli olduğu iyi bilinmektedir. Çoğu insanda enfeksiyon kaynağı bir yaradır. Diğerlerinde, tetanoz yanık yaralanması, cerrahi işlem sonrası oluşan apse, intravenöz ilaç kötüye kullanımı veya

kangrenden gelişebilir. Çoğu durumda, hastaların aşıları eksiktir veya aşılanmamıştır. Bu nedenle korunma için aşı önemlidir (186).

Tetanoz vakalarının çoğu, bağışıklığın yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde ve özellikle doğal afetlerin meydana geldiği bölgelerde görülmektedir. *C. tetani* sporları çevrede coğrafi konumdan bağımsız olarak bulunurlar. Sporlar toprakta bulunur ve derideki bir açıklıktan girebilir. Tüm yaşlardaki insanlar enfeksiyona duyarlıdır ve acil tıbbi müdahale edilmezse vaka ölüm oranı %100'e yaklaşabilir. En yüksek risk altındaki yaş grupları, bağışıklığın düşük olmasına bağlı olarak çocuklar ve yaşlılardır. Az gelişmiş ülkelerde, göbek kordonunu kesmek için sterilize edilmemiş tıbbi ekipman kullanıldığından yenidoğanlar risk altındadırlar. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2015 yılında yaklaşık 34.000 yenidoğanın neonatal tetanozdan öldüğünü tahmin etmektedir (187, 188).

C. tetani'nin zorunlu bir anaerob olduğu göz önüne alındığında, anaerobik doku yarısı, *C. tetani*. 'nin replikasyonu ve çoğalması için ideal bir ortam sağlar. Yara bölgesinde kapsamlı bakteri replikasyonunun ardından, tetanospazmin ve tetanolizini kodlayan genler aktifleşir. Tetanoz toksini (TeNT), polisialogangliosidler ve nidojenler dahil olmak üzere spesifik reseptörlerle etkileşime girerek periferik sinir uçlarına bağlanır, daha sonra motor nöronlarla retrograd olarak taşınır ve merkezi sinir sisteminde internöronlara girer, nörotransmitterlerin (glisin ve GABA) salınmasını kontrol eden proteinleri inaktive eder. Klinik semptomlar kas sertliği, ağrılı spazmlar ve otonomik dengesizlik ile karakterizedir (189, 190, 191).

Tetanozun kuluçka süresi yaklaşık 8 gündür ancak 3 ila 21 gün arasında değişmektedir.

Yenidoğan tetanozu 1 aydan küçük çocuklarda görülür ve kuluçka süresi daha kısadır. Anne aşısının olmamasına ek olarak, genellikle doğumdan sonra göbek kordonunun steril olmayan şekilde kesilmesinden kaynaklanır.

Jeneralize tetanoz en tanınabilir ve iyi bilinen formdur ve trismus, disfaji, ense sertliği, opistotonus (baş, boyun ve omurganın geriye doğru kavislenmesi), risus sardonicus (sırıtmaya benzer yüz kaslarının sürekli spazmı), sistemik sertlik ve tonik kasılmalar gibi spesifik klinik bulgularla karakterizedir. Hastalar ayrıca nefes darlığı ve nihayetinde hava yolu tıkanıklığı ve apne olarak ortaya çıkan solunum sıkıntıları yaşayabilir. Hastalarda genellikle bu kasılmalardan kaynaklı dayanılmaz ağrılar gelişir

ve bu da tendon kopması ve kırıklarla sonuçlanabilir. Tetanozun klinik görünümü bazen otonomik aşırı aktivite semptomlarını (sinirlilik, huzursuzluk, terleme ve taşikardi) içeren erken bir evreye sahip olabilir.

Lokal tetanoz nadirdir ve lokalize bir vücut bölgesinde kas kasılmaları ile kendini gösterir.

Sefalik tetanoz, disfaji, trismus ve fokal kraniyal nöropatiler olarak ortaya çıkabilen ve bazen serebrovasküler bir kaza ile karıştırılabilen bir lokal tetanoz şeklidir. Bu vakalar nadirdir ve bir kulak enfeksiyonu veya kafa travması sonrasında ortaya çıkabilir.

Tetanoz teşhisi fizik muayene, bağışıklama öyküsü ve klinik sunuma dayanırken laboratuvar testlerine daha az önem verilir. Ayırıcı testler kan, idrar ve doku tahlillerini içerir (188,192).

2.4. Mikrobiyota Üyeleri ve Enfeksiyon Etkenleri Olarak Anaeroblar

Anaeroblar, farklı vücut bölgeleri boyunca ortak mikrobiyotada bol miktarda bulunur (193, 194,195). Anaerobik enfeksiyonların çoğu endojendir ve mukozal/kutanöz bariyerlerde oluşan hasarlar sonucu aerobik/fakültatif bakterilerle birlikte steril dokulara penetre olur. Çoğu enfeksiyonda anaerob bakterilerin aerobik/fakültatif bakterilerle birlikte bulunduğundan, tanımlama için onları saf kültürde izole etmek zordur. Anaerob bakterilerin çeşitli türleri vücudun hemen hemen tüm bölgelerinde enfeksiyonlara neden olur ve ciddi kan dolaşımı enfeksiyonlarına da yol açabilir (Tablo 3) (195, 196).

Tablo 3. Klinik olarak önemli bazı enfeksiyonlarda anaerob bakterilerin tespit oranları (194, 195, 197, 198)

Anaerobların yaygınlığı	Çok yüksek (%70-%100)	Yüksek (%40-%70)	Orta (%13-%45)	Düşük (%4-%10)	Çok düşük (%0-%4)
Baş ve boyun	Diş ve ağız enfeksiyonlarının çoğu, baş ve boyun selülit ve apseler, kök kanal enfeksiyonları, peritonsiller apse, kronik sinüzit, ameliyat sonrası enfeksiyonlar	Kronik otitis media, mastoidit	Oküler enfeksiyonlar (dakriyosistit, travma sonrası endoftalmi, perfore kornea ülserleri), servikal lenfadenit, seröz otit medya, tonsillofarenjit	Akut sinüzit, akut otitis media	
Kan	Karın içi sepsis, septik abort	Ameliyat/diş çekimi sonra bakteriyemi,		Endokardit nedeniyle oluşan bakteriyemi	
SSS	Beyin apsesi, subdural ampiyem			SSS şant enfeksiyonları	Menenjit
Akciğer	Akciğer apsesi, aspirasyon pnömonisi, nekrotizan pnömoni, plevral ampiyem		Bronşektazi, Pnömoni		
Deri/yumuşak doku	Gazlı kangren, meme apsesi, nekrotizan selülit, perianal ve perirektal apse, enfekte diyabetik kangren, pilonidal apse, travma sonrası enfeksiyonlar, akne vulgaris	Yara enfeksiyonları, apseler, selülit, nekrotizan fasiit, ısırık yarası, diyabetik ayak enfeksiyon, enfekte dekübit ülserleri	impetigo		
Karın	Karın içi enfeksiyonların çoğu, apendiküler apse, apandisit ile peritonit, ameliyat sonrası karın enfeksiyonlar	Karaciğer apsesi	Safra yolu enfeksiyonları, asit ve hepatik apse		
ABD (antibiyotiğe bağlı diyare)	Psödomembranöz kolit (Clostridium difficile)		Genel ABD (Clostridium difficile ve Clostridium perfringens)		
Kemik/eklem		Ortopedik cihaz enfeksiyonlar	Osteomyelit, ortopedik cihazlar olmadan enfeksiyonlar	PJI'ler (protez eklem enfeksiyonlar)	
Ürogenital	Çoğu kadın genital sistem enfeksiyonu (pelvik inflamatuvar hastalık, pelvik apseler, endometrit, vajinal apse, bakteriyel vajinoz)				İdrar yolu enfeksiyonlar

2.5. Anaerobik Mikrobiyoloji İçin Numunelerin Toplanması ve Taşınması İçin Temel Gereksinimler

Klinisyenler, anaerobik mikrobiyolojiden tam olarak yararlanmak için spesifik önerilere göre klinik örnekleri toplamalı ve laboratuvara göndermelidir (Tablo 4).

Anaerob kültür için numuneler şöyle olmalıdır:

(i) Antibiyotik tedavisine başlamadan önce veya bu mümkün değilse, bir sonraki ilaç uygulamasından hemen önce uygun bir zamanda toplanır. (ii) Uygun yerden örnek alınmalıdır. Örneğin, yara enfeksiyonları ve açık abselerde irin veya yüzeysel örnekler yerine yara kenarından (bakterilerin çoğaldığı yerde); derin aspiratlar/doku biyopsileri, kapalı apselerde ise lezyonun sınırlara yakın yerinden derin iğne aspiratları alınmalı. (iii) Örnek almak için kurumaya meyilli ve inhibitör yağ asitleri içeren, gözenekli pamuklu çubuklar yerine, sentetik liflerden yapılmış swabların kullanılması önerilir. (iv) Kommensal mikrobiyota ile kontaminasyonu önlemek için cilt dekontaminasyonu gereklidir. (v) Örnek yeterli hacimde alınmalıdır (örn. kan/şişeden 8-10 mL, aspiratlar >1-2 mL, dokular 1 g, *C. difficile* için sulu/yarı şekilli dışkı örnekleri 5 mL). (vi) Örnekler anaerobik transport besiyerine (ATB) alınmalıdır. En iyi ATB'ler anaerobik ortama sahip ticari olarak temin edilebilen oksijensiz taşıma tüpleri/şişeleridir. Mevcut değilse Stuart's, Cary Blair veya Amies taşıma ortamı laboratuvarda hazırlanabilir. (vii) örnekler düşük sıcaklıklarda buzdolabında değil, oda sıcaklığında saklanır ve taşınır, düşük sıcaklıkta oksijen difüzyonu artar. (viii) Örnekler ATB'lerde 2 saat içinde laboratuvara gönderilir, ancak gecikme kaçınılmazsa 8-48 saat içinde bile kabul edilebilir. ATB yoksa, büyük hacimli (2 mL) aspiratlar steril kaplara konulmalıdır. Bu gibi durumlarda hızlı (1 saat içinde) transport gereklidir.

Tablo 4. Anaerobik kültür için çeşitli örneklerin uygunluğu (195, 198, 199, 200, 201, 202).

Enfeksiyon bölgesi	Kabul edilebilir örnekler	Kabul edilemez örnekler
Kan	Anaerobik kan şişelerinde kan (8-10 mL/şişe veya ağırlığa göre)	Kateter/kateter ucu
Santral Sinir Sistemi	Bozulmamış dekontamine edilmiş yüzeyden doku biyopsileri veya iğne aspirasyonları	Yüzey sürüntü
Baş ve boyun	Perkütan iğne aspiratları, cerrahi örnekler. Lemierre sendromu aspiratları için doku biyopsiler. Aktinomikoz sülfür granülleri için de aynı	Lemierre sendromu hariç ağız, burun ve boğaz sürüntüsü
Periodontal	Apse aspiratları, subgingival sinüs örnekleri	Yüzey dişeti ve oral sürüntüler
Kulak	Orta kulak iltihabında: timpanosentez ile aspirasyonlar (steril mikropipetlerle)	Yüzey materyal
Göz	Kornea kazıma, vitröz sıvı iğne aspiratları, konjonktival sürüntüler	
Apseler	Kapalı apse: dekontamine dokudan aspirat, cerrahi numuneler; fistüller/sinüsler: dezenfekte edilmiş cilt açıldıktan sonra plastik kateterle alınan derin aspirat	Deri/mukozal yüzey sürüntüler, irin
Pulmoner	Plevral sıvı, akciğer ve transtrakeal aspiratlar, akciğer-doku biyopsileri, çift lümenli (korumalı) kateter ile alınan derin bronşiyal sekresyonlar	Nazofaringeal sürüntüler, balgam
Karın boşluğu	Periton ve asit sıvı aspiratları, cerrahi biyopsiler, safra aspiratları	İleostomi/kolostomi örnekleri
Dışkı	Yalnızca Clostridium difficile veya Clostridium botulinum için	Diğer anaeroblar için
Kadın genital yolu	Doku biyopsileri, pelvik enfeksiyon aspiratları (kuldosentez ile) periton sıvısı, endometrial numuneler (korumalı kateterlerle), cerrahi numuneler	Servikal/vajinal sürüntüler (bakteriyel vajinozis hariç)
Kemik	Aspiratı, kemik biyopsileri. Birkaç biyopsi alınması önerilir	Sürüntüler, yumuşak doku örnekleri
Eklem	Anaerobik kan kültürü şişelerinde protez eklem sinovyal sıvı aspirasyonları, anaerobik broth ortamında periprostetik biyopsiler	Yaraların/fistüllerin yüzey sürüntüleri
Yaralar/yumuşak dokular	Derin biyopsi örnekleme, debridmandan ve steril salin veya alkol ile yüzeyin temizlenmesi sonrası yara kenarında derin yara aspirasyonu	Yüzey sürüntüleri, irin, sinüs yolları
Dekübit veya cilt ülserleri	İğne aspiratları veya doku biyopsileri. Lezyon tabanından derin örnekleme	Yüzey material, sürüntüler
Diabetik ayak ülserleri	Kemik biyopsileri (cerrahi veya debridman ve yüzey dezenfeksiyonu sonrası)	Doku örnekleri daha az uygun
İdrar	Mesane idrarı (suprapubik mesane aspiratları)	Boşalmış ve kateterize idrar

2.6. Laboratuvarda Örneklerin İşlenmesi

Anaerobik kültür için numune kabul eden tüm klinik mikrobiyoloji laboratuvarları, anaerobları izole edecek ve ana anaerobik grupları tarayacak tesislere sahip olmalıdır (Seviye 1 ve 2 anaerobik laboratuvarlar) (195). Kesin tanımlama ve ADT için izole edilmiş anaeroblar referans laboratuvarlara yönlendirilmelidir. Seviye 3 anaerobik laboratuvarlar, fenotipik ve enzimatik testler kullanarak anaerobları cins ve tür düzeyinde tanımlamalı ve bazı olası antibiyotik duyarlılıklarını belirlemelidir.

Seviye 4 anaerobik laboratuvarlar, MALDI-TOF MS ve gerekirse 16S rRNA gen dizilimi kullanarak nihai tanımlama sağlamalı ve kantitatif ADT yapmalıdır (195).

Kabul edilebilir numunelerin görsel (makroskobik) olarak incelenmesinden sonra (Tablo 4) tüm numuneler sıvı ortamda (örneğin tiyoglikolat) homojenize edilmelidir. Anaerobik teşhis için örneğin doğrudan Gram boyaması zorunludur. *Fusobacterium nucleatum*, *B. fragilis* veya *C. perfringens* gibi karakteristik morfolojiye sahip bazı anaerobik türlerin olası katılımını ortaya çıkarabilir. Ayrıca, apse veya sinüs yollarından alınan numunelerde dallanan filamentli gram pozitif basillerin gözlemlenebildiği aktinomikoz durumunda teknik kültüre kıyasla daha yüksek hassasiyet göstermiştir (203).

Başlangıç anaerobik kültür işlemi, örneklerin seçici ve seçici olmayan kanlı agar besiyerlerinin (taze hazırlanmış veya piyasadan temin edilebilir) yanı sıra sıvı anaerobik ortamda (tiyoglikolat) dikkatli bir şekilde ekilmesini içermelidir. Birincil zenginleştirilmiş (at veya koyun kanı, K1 vitamini ve hemin ile) seçici olmayan besiyerleri, klinik olarak önemli tüm anaerobların üretilmesi için kullanılır. ABD'deki pek çok laboratuvar, zorunlu anaerobik patojenleri izole etmek için ticari olarak mevcut PRAS (Pre-Reduced, Anaerobically Sterilized) ortamını kullanmayı tercih etmektedir (195); ancak taze hazırlanmış anaerobik ortam da başarıyla kullanılabilir. Numune, Gram boyama sonuçlarına dayanarak, daha fazla seçici besiyerine (örneğin *Bacteroides* safra eskülin agar, kanamisin vankomisinli kanlı agar, feniletıl alkol agar, yumurta sarısı agar) ekilebilir. Dışkı örneklerinden *C. difficile* izolasyonu gerekiyorsa, klasik sikloserin-sefoksitin fruktoz agar veya piyasada bulunan diğer seçici kromojenik besiyerleri kullanılabilir (195, 202). Bazı laboratuvarlarda numuneler anaerobik kabinde işleme alınır. Genellikle çalışma anaerobik bir ortamın dışında gerçekleştirilir, ancak oksijene maruz kalmayı sınırlamak için, ekilmiş besiyerlerini ekimden 15-20 dakika sonra anaerobik bir ortama (plastik zarflar, kutular, kavanozlar veya anaerobik odalar) yerleştirmek önemlidir. Önerilen inkübasyon süresi genellikle en az 48 saattir, ancak bazı anaeroblar (*C. perfringens* gibi) daha erken koloniler oluşturabilir. Bununla birlikte, birkaç yavaş büyüyen anaeroblar, doğrudan tanımlama için uygun koloniler oluşturmak için çok daha uzun birincil inkübasyon süresine (3-5 güne kadar) ihtiyaç duyabilir. Prostatik eklem enfeksiyonlarından *Cutibacterium* spp. tespiti gibi özel durumlarda anaerobik buyyon 14 güne kadar tutulmalıdır (195, 204).

2.7. Anaerob İnkübasyon Teknikleri

Kültür, anaerobik bakterilerin tanımlanması için altın standart olmaya devam etmektedir. Anaerobik bakterilerin klinik örneklerden izole edilmesinde elde edilen başarı düzeyini genellikle üç faktör belirlemektedir. Bunlar uygun numunelerin toplanmasında, numunelerin taşınmasında, işlenmesinde ve inkübasyon sisteminin verimliliğinde kullanılan yöntemlerdir. Anaerobları izole etmedeki başarı, numunelerin uygun şekilde seçilmesi ve toplanmasından sonra, numune veya kültür içindeki oksijen gerilimini nispeten düşük bir seviyede tutma yeteneğine bağlıdır. Klinik örneklerden anaerob bakterilerin izolasyonu için birçok sistem mevcuttur. Kavanoz sistemi en eski ve daha uyarlanmış iken, poşetler pek çok araştırmacı tarafından popüler değildir. Anaerobik odaların bakımı pahalıdır ve teknik olarak esnek değildir. Anaerobik kavanozlarda, anaerob ortam tahliye - değiştirme tekniği veya gaz üreten zarfların (BBL GasPak zarfları; Becton Dickinson Mikrobiyoloji Sistemleri, Cockeysville, Md.) kullanımı yoluyla oluşturulur. Poşet sistemi ve anaerobik kavanozlar veya kaplar çoğunlukla kimyasal anaerob atmosfer üreten sistemlere bağlıdır (Biobag tip A, MarionScientific, Kansas City, Mo; AnaeroPack sistemleri, Mitsubishi Gas Chemical America, Inc., New York, NY; BBL GasPak zarflar, BectonDickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.; GENbag system, bioMerieux, sa, 69280Marcy-1 Etiole, Fransa; Anaerobik PouchSystem Catalyst-Free, Difco Laboratories, Detroit, mich.). Anaerobik çalışma için bir dizi kimyasal, reaktif, ortam ve ekipman ticari olarak mevcuttur. Bunlar, anaerobik bakterilerin artan klinik önemini kanıtlar, bu nedenle bu tesislerin işlevselliklerini ve kapsamını doğrulamak için sürekli olarak değerlendirilmesi gerekir. Daha önceki çalışmalar, kimyasal anaerobik atmosfer üreten sistemlerin (AnaeroPack, Biobag tip A ve BBL GasPak sistemi) anaerobik odalara kıyasla daha uygun olduğunu göstermiştir. Anaerobların çoğu için AnaeroPack poşeti, anaerobik oda ve diğer sistemlerden nispeten daha etkilidir. AnaeroPack sisteminin daha iyi performansı, üretilen daha yüksek CO₂ konsantrasyonu ile ilişkilendirilmiştir (GasPak sisteminde %4-10 ve odalarda %10'a karşı %18). Buna karşılık, anaerobik oda ve GasPak sistemi, periodontal örneklerden *Peptostreptococcus micros* ve *Bacteroides forsythus* izole etmek için AnaeroPack sisteminden daha verimlidir, ancak her üç sistem de *Porphyromonas* ve *Prevotella*'yı izole etmede eşit derecede etkilidir (205). Herhangi bir anaerobik sistem, klinik olarak önemli anaerobların çoğunun uygun şekilde

büyümesi için gereken düşük oksijen konsantrasyonunda renksiz hale gelen anaerob indikatör şeritlerinin (metilen mavisi veya resazurin ile) eklenmesiyle izlenmelidir.



Şekil 3. Anaerob inkübasyon teknikleri: A- GasPak sistemi. B- AnaeroPack poşet. C- Anaerobik oda

2.8. Anaerob Bakterilerin İdentifikasyonu

Kolonilerin ilk incelenmesi bir stereomikroskop veya en azından güçlü bir büyüteç kullanılarak yapılmalıdır. Uzaktan bakıldığında benzer görünen koloni morfolojileri büyütüldüğünde ayırt edilebilir ve daha büyük kolonilerin yakınında küçük kolonilerin varlığı fark edilebilir. İzole edilen tüm farklı kolonilerden besiyerine ekim yapılır ve Gram boyama için preparat hazırlanır. Hem plaklara hem de lam üzerine aynı koloninin konulmasına dikkat edilmelidir. Günümüzde bazı rutin laboratuvarlar, anaerobik bir ortamda birincil plaktan kolonilerin subkültürlenmesinden sonra gerçekleştirilen izolasyona hala güvenmektedir (195) (seviye-1 düzeyinde tanımlama).

Koloni ve Gram boyamada bakteri morfolojisinin ve hareketliliğinin araştırılmasının yanı sıra, hızlı biyokimyasal testlerin (indol, katalaz, nitrit, üreaz pozitifliği tespiti gibi) ve kanamisin (1000 mg), vankomisin (5 mg), kolistin (10 mg) gibi özel etkili antibiyotik diskleri ile yapılan antibiyogramın bir kombinasyonu, klinik önemi olan major anaerob gruplarının identifikasyonu için kullanılabilir (seviye-2 düzeyinde tanımlama). Bu varsayımsal tanımlamalar uygun maliyetlidir, ancak birincil plaktaki kolonilerin izolasyonundan sonra 24-48 saat sürer. Bazı *Prevotella* ve *Porphyromonas* spp. %20 safra varlığında 4 günlük inkübasyondan sonra ürer ve kolonilerinin pigmentasyonu (kahverengiden siyaha) görülür. Uzun dalga UV ışığı, bazı kolonilerin karakteristik floresansını saptamak için kullanılabilir (örn. *C. difficile*-sarı-

yeşil, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas asaccharolytica*-tuğla kırmızısı) (195).

Anaerop bakterilerin identifikasyonunda kullanılan seviye1 ve 2 düzeyindeki tüm testlere rağmen anaerop bakteri tanımlama yüzdesi maksimum %75 civarındadır. Bunun en temel sebepleri arasında, anaerop bakterilerin izolasyonundaki zorluklar ve zaman içerisinde sürekli olarak meydana gelen taksonomik değişiklikler söylenebilir.

Tüm bu zorluklara rağmen, anaerop bakteri tanımlamada duyarlılığı çok yüksek testler geliştirilmiştir. Seviye-3 düzeyindeki bu identifikasyon testleri şunlardır (206, 207,208);

- Enzim Tanımlama Sistemleri (Rapid ID 32A, RapID ANAII, ANI Card-Vitek)
- Özel Biyokimyasal Sistemler (API, BBL Crystal Anaerobe, Sceptor Anaerobe)
- Metabolik Son Ürünleri Tespit Eden Sistemler (Metil Ester Analizleri, Sitotoksisite Testleri, Gaz-Sıvı Kromatografisi, Serbest Yağ Asidi Analizleri)
- Enzim Substratı Taşıyan Sistemler (ROSC0 Tablet)
- Matrix-Aracılı Lazer Desorpsiyon-Kütle Spektrofotometrisi (MALDI-TOF MS)
- Nükleik Asit Prob Tekniği ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Yukarıda belirtilen yöntemler, klinik olarak önemli bir anaerobik suşu cins veya tür düzeyinde doğru bir şekilde tanımlayamadığında, 16S rRNA geninin bir bölgesi gibi genetik belirteçlerin dizilenmesi tanımlama için kullanılabilir (196, 209).

2.9. Anaerob Bakterilerin Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Birçok anaerob bakterinin direnç profili, hem ülke içinde hem de ülkeler arasında son on yılda önemli ölçüde değişmiştir. Bu durum anaerob bakterilerin antimikrobiyal duyarlılığını daha fazla tahmin edilemez hale getirmiştir (210, 211). Uluslararası kılavuzlara göre, anaerobik bakterilerin duyarlılık testi çok pahalı, zaman alıcı olduğundan ve deneyimli laboratuvar personeli gerektirdiği için rutin laboratuvar da her izolatının test edilmesi garanti edilmez. Bu mikroorganizmaların üretilmesinin bile zor olduğu bazı teşhis kurumları vardır (örneğin, teknik yetenekleri olmayan düşük gelirli ülkelerde). Bu durumlarda, izolatlar genellikle daha yüksek seviyeli tesislere veya ulusal bir anaerobik referans laboratuvarına gönderilir. Mevcut önerilere dayanarak, aşağıdaki durumlarda duyarlılık testi yapılmalıdır: (i) ciddi ve yaşamı tehdit edici nitelikte enfeksiyonlar (örn. endokardit, bakteriyemi, beyin içi apseler), (ii)

tekrarlayan enfeksiyonlar veya ampirik tedaviye hiç yanıt vermeyen enfeksiyonlar, (iii) antibiyotik tedavisinin uzun bir süre devam etmesi gerektiğinde (örneğin, kemikleri, eklemleri, implante edilmiş cihazları veya greftleri içeren enfeksiyonlar), (iv) verilen organizmanın duyarlılığına ilişkin sınırlı veri var veya mevcut değil ise, (v) mikroorganizma tarafından antimikrobiyal maddeye karşı bilinen bir direnç modeli var ise, (vi) etken madde, öngörülemez dirence sahip, özellikle öldürücü bir anaerob ise (Tablo 5), (vii) mikroorganizma saf kültürde ve/veya normalde steril bir vücut bölgesinden izole edilmiş ise; bunların yanı sıra, mümkün olan her yerde, epidemiyolojik amaçlar için ve terapötik ajanların seçimine rehberlik etmesi için duyarlılık testi yapılmalıdır.

Tablo 5. Rutin duyarlılık testinin önerildiği anaerobik bakterilerin listesi, CLSI, 2019 (10,93)

Bacteroides fragilis grubu
Bilophila wadsworthia
Clostridium innocuum
Clostridium perfringens
Clostridium ramosum
Fusobacterium spp.
Prevotella spp.
Sutterella wadsworthensis
Yeni klinik olarak önemli anaeroblar (gözetim verilerinin mevcut olmadığı durumlarda)

Tablo 6. Anaerobik izolatlar arasında rutin duyarlılık testine dahil edilmesi gereken antimikrobiyal ajanlar CLSI 2019 (10, 93)

Zorunlu ^a	Yardımcı ^b
5-nitroimidazol grubu ilaçlar ^c	Sefoksitin
Penisilinler	Moksifloksasin
Beta-laktam-beta-laktamaz inhibitör kombinasyonu ^d	Tigesiklin
Klindamisin	Vankomisin ^f
Karbapenemler ^e	Fidaksomisin ^f

^a Bakterinin etkene karşı intrinsik direnci yoksa doğru ^b Ajan, söz konusu enfeksiyon için FDA (Food and Drug Administration) , EMA(European Medicines Agency) tarafından uygun endikasyonlara sahipse; ^c Metronidazol, tinidazol, seknidazol, onidazol dahil; ^d Amoksisilin/klavulanik asit, tikarsilin/klavulanik asit, ampisilin/sulbaktam, piperasilin/tazobaktam dahil; ^e İmipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem dahil; ^f Clostridium difficile durumunda ilgili.

Tablo 7. Anaerobik bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık testi için mevcut yöntemler (212)

Yöntem	Artıları	Eksileri	Yorum
Agar dilüsyon	Doğrulanmış yöntem. Aynı anda birçok izolat incelenirse maliyeti uygundur	Emek yoğun	Referans standardı
Broth mikrodilüsyon	Ticari testler mevcuttur, bir mikrotitre tepesinde multipl antibiyotikler, nispeten ucuzdur	Ticari ürünlerde sabit antibiyotiklerin olması, orta yoğun emek, sadece <i>Bacteroides fragilis</i> grubu için uygundur.	Ticari ürünlerle ilgili çalışmaların sınırlı sayıda olması
Gradyan Testleri	Kolay ve esnektir, bazı antibiyotiklere karşı heterodirenci algılayabilir	Masraflı	Belirli türlerle ilgili performans ve uyarılarda endişeler
Disk difüzyonu	Ucuz, kolay, esnek	Doğrulanmış bir yöntem yok, ağırlıklı olarak hızlı büyüyen anaerobik türler üzerinde çalışılmıştır.	EUCAST geliştirme projesi

Agar dilüsyon yöntemi şu anda anaerobik bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık testi için altın standarttır. Bu prosedür sırasında, besiyerine farklı konsantrasyonlarda çeşitli antibiyotikler dahil edilerek agar plakları (CLSI tavsiyelerine göre %5 defibrine koyun kanı, 5 µg/mL hemin ve 1 µg/mL Vitamin K1 ile desteklenmiş Brucella Agar) yapılır, ardından plakalara standart sayıda (48 saat süreyle inkübe edilen saf bir kültürden 0,5 McFarland standardı inokulum) bakteri aşılır. Anaerobik atmosferde 48-72 saat inkübasyonundan sonra plakalar okunur ve görsel olarak karşılaştırılır. Bu yöntemle dayanarak, bakteri süşunun çoğalmasını engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak belirlenir.

Standart broth mikrodilüsyon panelleri, her bir antimikrobiyal maddenin sadece bir veya birkaç konsantrasyonunun tek bir panelde test edildiği panelleridir. Ne yazık ki, bu yöntem anaerobik bakteriyoloji için çok yönlü bir çözüm değildir, çünkü *Bacteroides* spp dışında. diğer türlerin üremesi et suyunda tutarlı değil (homojen büyüme elde edilemez, bu da yanlış duyarlılığın bildirilmesine yol açar, görünür bir büyüme göstermeyen spor oluşturan bakteriler de hatalı olarak duyarlı olarak bildirilebilir). Bu yöntemin bir diğer önemli dezavantajı, yalnızca anaerobik glove box sisteminde

uygulanabilmesidir. Bu nedenle klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kullanımı sınırlıdır (212).

E-test gibi gradyan testleri, anaerobik duyarlılık testi yapmak için hastane laboratuvarlarında en sık kullanılan testlerdir. Prosedür sırasında, bakteri suspansiyonunun inokülasyonundan sonra plak üzerine bir kâğıt şerit (gradyan tarzında önceden belirlenmiş miktarda antibiyotik ve MİK tayini için bir skala içeren) yerleştirilir. İnhibisyon zonu kendisini eliptik bir şekilde sunacaktır (dolayısıyla test adındaki 'E' buradan alınmıştır), inhibisyon bölgesinin stripe kesiştiği noktada MİK okunmalıdır. E-testinin MİK okuması, aşılınmış bakteri süspansiyonunun koloni oluşturan birimlerinin (CFU) sayısından bağımsızdır, bu nedenle sonuçlar güvenilir kabul edilmelidir ve referans yöntemle iyi bir korelasyon vardır. Gradyan testleri için standart besiyeri, %5 koyun kanı içeren, K1 vitamini ve hemin eklenmiş Brucella agardır.

Spiral Gradyan Testi, üzerine bir cihazın spiral bir desende belirli miktarda antibiyotik stok solüsyonu biriktirdiği özel bir agar plakasının kullanılmasını gerektiren duyarlılık testi yöntemidir. Bakteri suspansiyonu, plakanın merkezinden spiral boyunca radyal olarak çizilir (böylece tek bir plakta birden fazla izolat inoküle edilebilir ve tek bir antibiyotiğe duyarlılıkları aynı anda belirlenebilir). Spiralde bakteri üremesinin sona erdiği noktadaki ilaç konsantrasyonu, onun MİK değeridir. Bu yöntem, kullanımı kolay olduğu ve agar seyreltme sonuçlarıyla karşılaştırıldığında olumlu sonuçlar gösterdiği için giderek daha popüler hale gelmektedir, ancak referans yönteme benzer şekilde yüksek fiyatlıdır. Bu yönteme dayanan ticari olarak mevcut tasarımların olmaması ve gözlemlenen sonuçlardan MİK'nin hesaplanmasına yönelik ek ihtiyaç, bu yöntemin diğer dezavantajlarından bazılarıdır (93).

Şu anda ne EUCAST ne de CLSI, anaerobik bakterilerin ADT'i için disk difüzyon yönteminin kullanılmasını önermemektedir.

2.10. β -Laktamaz Testi

Anaerobların tedavisi, β laktam ilaçlarına karşı giderek daha dirençli hale geldikleri için zorlayıcıdır. β -laktamaz enzimi ilk olarak 1940 yılında Abraham ve Chain tarafından tanımlanmıştır. İlk olarak toprak bakterileri tarafından kendini çevreleyen bakterilerden korumak için üretilmiştir. Sonralar β -laktamaz enzimi üretimi

patojen bakterilerde de tespit edilmiştir. 1960'larda, Bacteroid penisilinazın β -laktamaz enzimi ürettiği bulundu, bu muhtemelen anaerobik bakteriler tarafından β -laktamaz üretiminin ilk kaydıydı (213). *Bacteroides fragilis* grubunun, *Fusobacterium* ve *Clostridium* türlerinin ve *Bilophila wadsworthia*'nın beta laktamaz ürettiği bildirilmiştir. İzole edilen ve tanımlanan tüm anaerob bakteriler, kromojenik Nitrocefin disk yöntemi ile beta-laktamaz üretimi için test edilebilir. Sarı renk pembe/kırmızıya döndüğünde bu test pozitif olarak kabul edilir.

2.11. Disklerle Yapılan İdentifikasyon

Gram boyamayı destekleme ve ön gruplandırmaya yardımcı olur. Mikroorganizmanın antimikrobiyotik duyarlılığını göstermez. Gram pozitif anaerob bakteriler kolistine dirençli, vankomisine duyarlı iken gram negatif bakterilerin çoğu vankomisine dirençlidir (214).

Tablo 8. İdentifikasyon diskleri ile anaerob bakterilerin ön tanısı (215)

Bakteri	Vankomisin (5MG)	Kolistin (10MG)	Kanamisin (1000MG)
Gram pozitif	S ¹	R	V
Gram negatif	R ²	V	V
<i>Fusobacterium</i> spp.	R	S	S
<i>Porphyromonas</i> spp.	S	R	R
<i>Veillonella</i>	R	R	S
<i>Prevotella</i>	R	R	V
<i>B.fragilis</i> grubu	R	R	R
<i>B.ureolyticus</i>	R	S	S

¹ Lactobacillus 'un bazı türleri ve *Clostridium innocuum* türlerinin çoğu vankomisine dirençlidir.

² *Porphyromonas* spp. vankomisine hassastır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Besiyerieri

Columbia Agar + %5 Sheep Blood (Biomerieux, France):

Klinik örneklerden, zor üreyen mikroorganizmaların izolasyonu için kullanılan, bakterilerin hemolitik reaksiyonlarının da değerlendirildiği oldukça besleyici, genel amaçlı bir besiyeridir.

Chocolate Agar + PolyVitex (Biomerieux, France):

Klinik örneklerde rastlanan özellikle *Neisseria*, *Haemophilus* cinsleri ve *Streptococcus pneumoniae* gibi zor üreyen türlerin üremesi için önerilen besiyeridir. Besiyeri PolyVitex ve hemoglobin tarafından sağlanan Faktor X (hemin) ve Faktor V (NAD) ile zenginleştirilmiş baz bir besinden oluşmaktadır. Bu besiyeri, saf kültür elde etmek amacıyla bakteri suşlarının pasajlaması için kullanılabilir.

Schaedler agar + %5 Sheep Blood (Biomerieux, France):

Özellikle zorunlu ve fakültatif anaerob bakterilerin tespiti için uygun olan bir izolasyon besiyeridir. Maya ekstraktı, hemin, vit K gibi üreme faktörleri ve koyun kanı eklenmesi ile çoğu zor üreyen organizmaların üremesi artırılıyor. İndirgeyici ajan (L-sistein) ve agardaki yüksek dektroz konsantrasyonu anaerob bakterilerin üremesini artırmaktadır.

Schaedler Kanamycin-Vancomycin Agar + 5% Sheep Blood (Biomerieux, France):

Schaedler agar + %5 Sheep Blood besiyerine eklenmiş kanamisin, gram negatif fakültatif anaerob basilleri ve diğer çeşitli fakültatif bakterileri inhibe ederken; vankomisin, gram pozitif bakterileri inhibe eder. Bu antimikrobiyallerin eklenmesi besiyerini *Bacteroides* ve *Prevotella* gibi gram negatif zorunlu anaeroblar için seçici hale getirir.

Brucella Blood Agar (Biomerieux, France):

Anaerob mikroorganizmaların izolasyonu ve E test yöntemi kullanılarak bu bakteriler için MİK belirlenmesi amacı ile kullanılır.

Thioglycollate Broth + Resazurin (Biomerieux, France):

Hem aerob hem de anaerob bakterilerin tespiti için kullanılır. Besiyerinde bulunan indirgeyici ajanlar (L-sistin ve Sodyum tiyoglikolat) ve maya özütü anaerob bakterilerin üremesini destekler.

Redoks indikatörü olan resazurin indirgeyici ortamda renksizdir, oksitlenmiş bir ortamda pembe renge dönüşür.

3.1.2. VITEK 2 (Biomerieux, France)

Entegre modüler bir sistemdir. İnce plastik kartlarda bulunan mikrokuyucuklardaki bakteriyel üreme ve metabolik değişiklikleri flöresan tabanlı bir teknoloji ile saptar. Gram negatif, gram pozitif, maya, *Neisseria-Haemophilus*, *Bacillus* ve anaerob ve *Corynebacterium*'lar için geliştirilmiş farklı panelleri bulunmaktadır. Çalışmamızda anaerob bakteriler için geliştirilmiş VITEK 2 ANC kartları kullandık.

Çalışmaya aldığımız bakteriler VITEK 2 cihazı ile tanımlandı. Tanımlanan tüm anaerob bakteriler Schaedler agara pasajlandı, 48 saatlik inkübasyondan sonra koloni morfolojisi ile VITEK 2 açısından identifikasyonu şüpheli koloniler tekrar VITEK 2 sistemi ile tanımlandı.

3.1.3. Kalite Kontrol Suşları

Çalışmamızda kalite kontrol suşları olarak *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 (Microbiologics) ve *Clostridium difficile* ATCC 700057 (Microbiologics) kullanıldı.

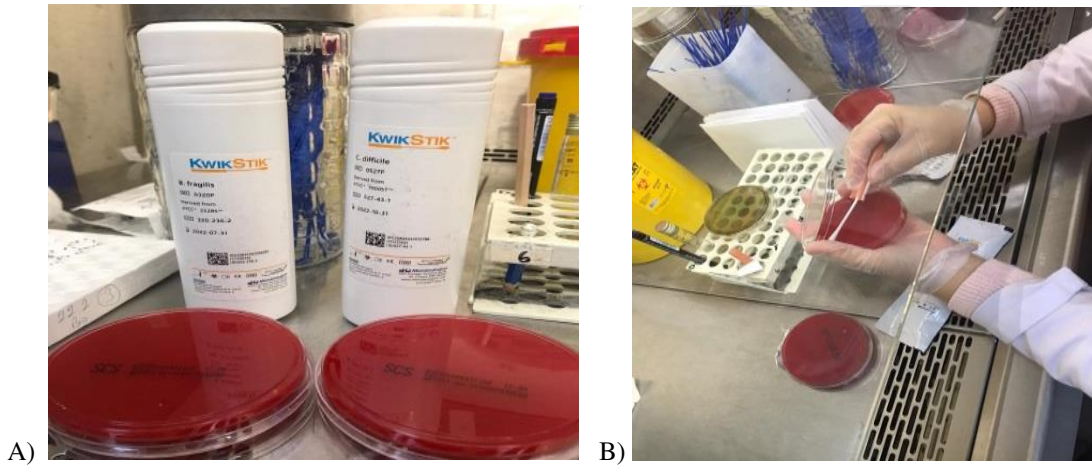
3.1.4. Nitrocefin Disk

Nitrocefin disk (Bioanalyse) yöntemi ile anaerob bakterilerin beta-laktamaz üretimi test edildi.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kontrol Suşların Çalışılması

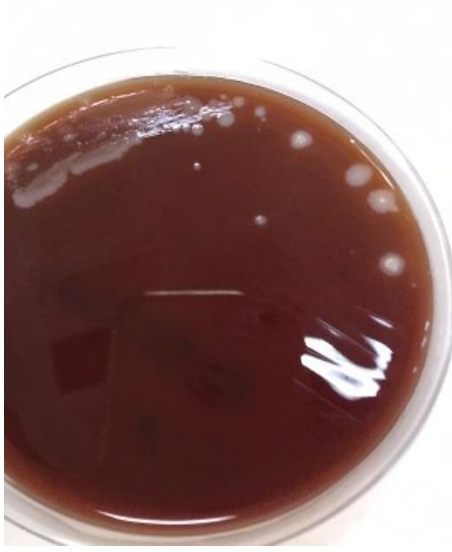
Laboratuvar personeli duyarlılık değerlendirmesini belirli bir dizi prosedüre göre yapmaktadır. Ancak ortam, ilaç, besiyerlerinin performansı veya kullanılan yöntem ile ilgili sorunlar nedeni ile testin güvenilirliği de her zaman garanti edilemez. Bu tür problemlerden kaçınmak için, duyarlılık testi yapılmadan önce kalite kontrol için bakteri suşları ile çalışılması gerekmektedir. Çalışmamızda da kontrol suşları olarak *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 ve *Clostridium difficile* ATCC 700057 suşları kullandık. Önce, kontrol suşları Schaedler agar + %5 Sheep Blood (Biomerieux) besiyerinde canlandırıldı, Gram boyalı prepatı hazırlandı, mikroskopik inceleme yapıldı. Sonra, Vankomisin (5 mg), Kolistin (10 mg), Kanamisin (1000 mg) diskleri ile ön tanımlama yapıldı. Nitrocefin disk testi yapıldı. Daha sonra Brucella Blood Agar (Biomerieux, Fransa) besiyeri kullanarak E-Testle antibiyotik duyarlılık testleri yapıldı ve sonuçların beklenen MİK aralıkları ile uyumlu olduğu belirlendi.



B. fragilis ATCC 25285

Kontrol suşlarının canlandırılması
C. difficile ATCC 700057

Şekil 4. Kontrol suşları (Çalışmamızdan). A- *B.fragilis* ATCC 25285 ve *C.difficile* ATCC 700057 kontrol suşları. B- Kontrol suşlarının canlandırılması



A)

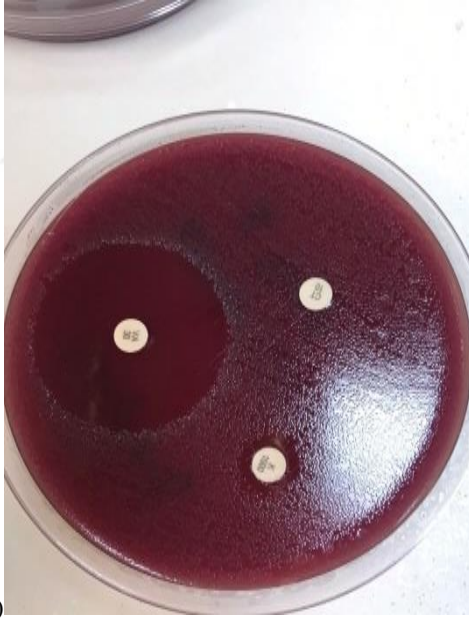


B)

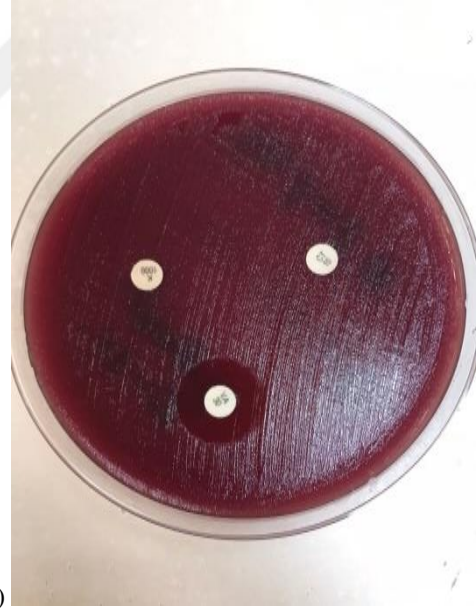
C.difficile ATCC 700057

B.fragilis ATCC 25285

Şekil 5. Kontrol suşların koloni morfolojisi(Çalışmamızdan). A - *C.difficile* ATCC 700057 suşunun koloni morfolojisi. B - *B.fragilis* ATCC 25285 suşunun koloni morfolojisi.



A)

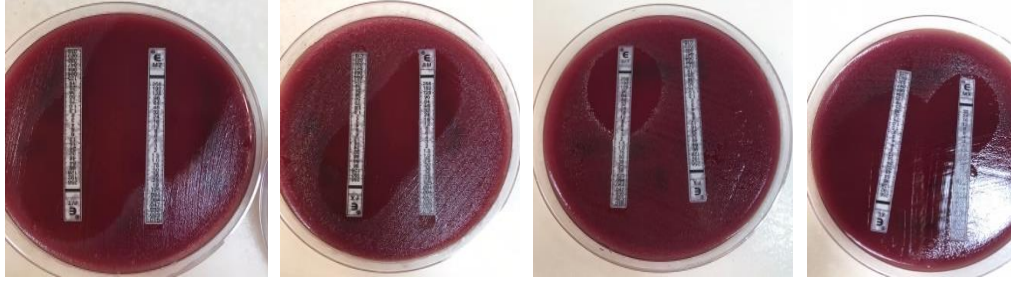


B)

C.difficile ATCC 70005

B.fragilis ATCC 25285

Şekil 6. Kontrol suşların disklerle tanımlanması (Çalışmamızdan). A- *C.difficile* ATCC 700057 suşunun Vancomisin (5mg), Kolistin (10mg), Kanamisin (1000 mg) diskleri ile tanımlaması. B- *B.frajilis* ATCC 25285 suşunun Vancomisin (5mg), Kolistin (10mg), Kanamisin (1000 mg) diskleri ile tanımlaması.



Şekil 7. Kontrol suşları, Brucella Broth Agar'da E-Test görüntüleri (Çalışmamızdan).

3.2.2. Örneklerin Toplanması

Çalışmamız Ocak 2021- Ekim 2021 tarihleri arasında bir yıllık bir süre boyunca yürütülen prospektif bir çalışmadır. Çalışma için kurumsal Etik Kurul'dan etik izin alınmıştır (BAP ID ve PROJE KODU: TTU-2020-13333) . Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesinin farklı bölümlerinden, anaerobik enfeksiyon şüphesi olan hastalardan alınan klinik örnekler üzerinde yapılmıştır. Diyabetik ayak ülserleri, baş ve boyun enfeksiyonları, meme apsesi, beyin apsesi, psoas apsesi, osteomyelit, kan kültürleri, periton aspirasyonları gibi etkilenen farklı vücut bölgelerinden doku, irin aspiratı, vücut sıvıları dahil numuneler toplanmıştır. Klinisyenler, mümkünse, örneklerin taşınmasında gecikmeden kaçınmaya teşvik edildi. Zaman kaybedilmeksizin laboratuvara ulaşan tüm örneklerin kültür, saflaştırma ve identifikasyon işlemleri yapıldı.

3.2.3. Örneklerin Taşınması

Abse ve sıvı örnekler enjektörle havası alınmış şekilde, doku örnekleri ise küçük kaplarda ve steril serum fizyolojik içerisinde laboratuvara taşındı. Örnekler alınır alınmaz, en geç 20 dakika içinde laboratuvara ulaştırıldı. Eğer örnek çok az ise veya sürüntü örneği tercih edilecekse hasta başında ekim yapıldı. Örnekler (abse, kan vs.) alınırken cilt veya mukoza yüzeyleri önce betadinle sonra %70'lik alkol ile temizlenmesine özen gösterildi.

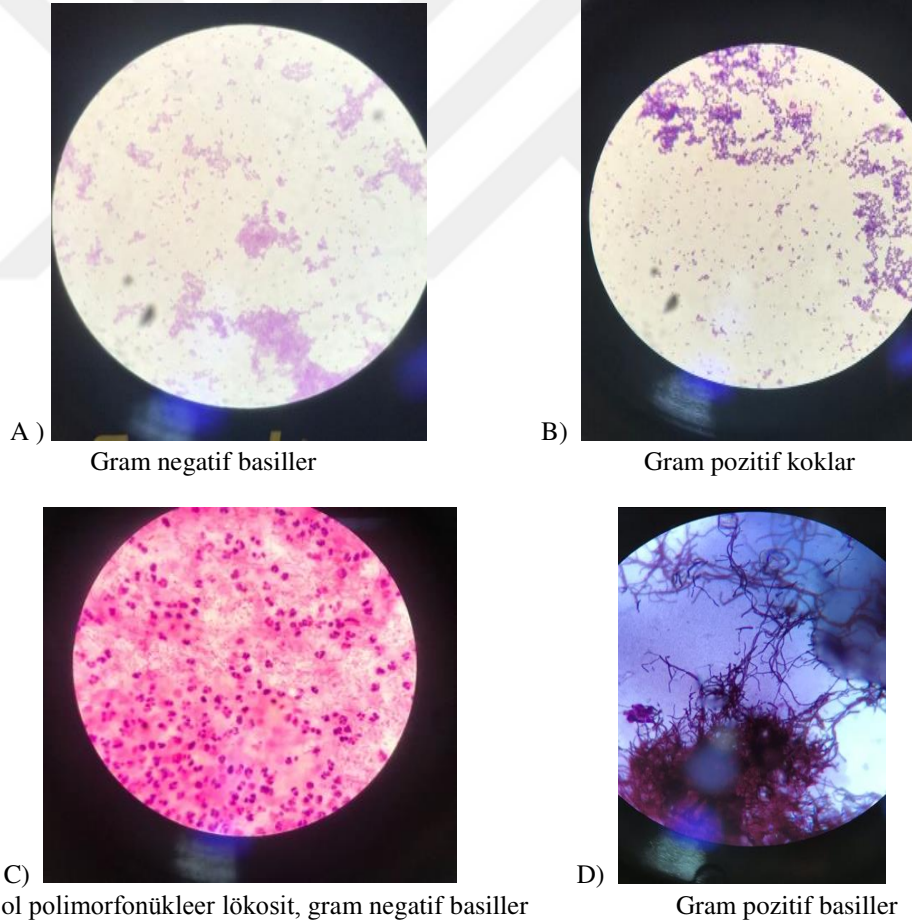
3.2.4. Örneklerin İncelenmesi

3.2.4.1. Makroskobik inceleme

Laboratuvara ulaşan örnekler pürülan, kanlı mukuslu, kötü koku ve sülfür granülleri içermeleri açısından incelendi. Bu örneklerin kalitesi ile ilgili ön fikir oluşmasına yardımcı oldu.

3.2.4.2. Mikroskopik İnceleme

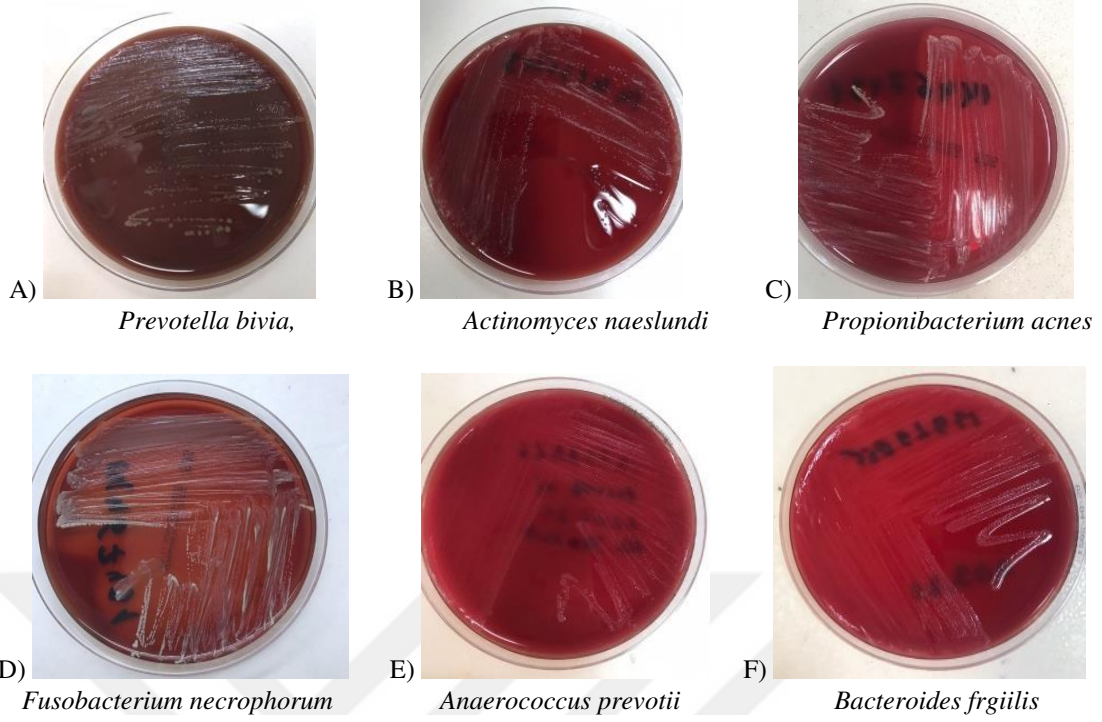
Örnekler ekim işlemine alındıktan sonra Gram ve Giemsa boyalı prepat hazırlandı, mikroskopik (polimorfonükleer lökosit, pleomorfik boyanma, spor formu vs.) inceleme yapıldı, sonuçlar kaydedildi.



Şekil 8. Bazı anaerob bakterilerin gram boyama görüntüleri (Çalışmamızdan): A- Gram negatif basiller, B-Gram pozitif koklar, C- Bol polimorfonükleer lökosit, gram negatif basiller, D- Gram pozitif basiller

3.2.5. Kültür

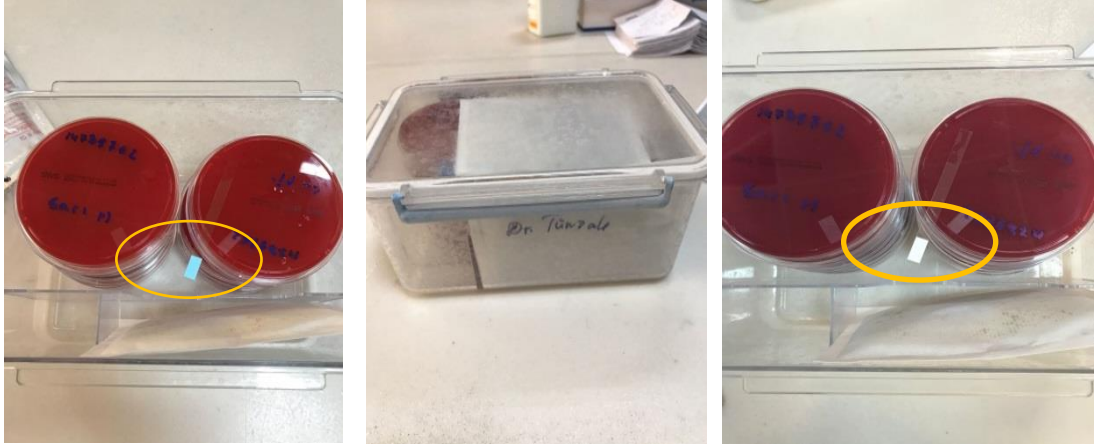
Uygun olan örneklerin anaerob ve aerob kültür için Columbia Agar + %5 Sheep Blood (Biomerieux, France), Chocolate Agar + PolyVitex (Biomerieux, France), Schaedler agar + %5 Sheep Blood (Biomerieux, France), Schaedler Kanamycin-Vancomycin Agar + 5% Sheep Blood (Biomerieux, France) besiyerlerine ekimleri yapıldı. Ayrıca rneklerin Thioglycollate Broth + Resazurin (Biomerieux, France) sıvı besiyerine ekimleri yapıldı. En iyi sonucu alabilmek için tiyoglikolatlı buyyon kullanılmadan önce ısıtıldı ve oda ısısına gelmesi beklendi. Plaklar 35-37°C’ de 48 -72 saat inkübe edilir. Anaerob inkübasyon amacıyla 2.5 lt’lik anaerob kavanozlar (jar) kullanıldı. Ekim yapılan besiyerleri jarın içine yerleştirildi. Anaerob ortamın oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla, kalite kontrol amaçlı, indikatör olarak metilen mavisi emdirilmiş kağıt stripler (Merck KGaA, Germany), dışardan gözlenebilecek şekilde, jarın içine yerleştirildi. Anaerob atmosferi sağlamak amacıyla, 2.5 lt’lik jarda anaerob ortam oluşturabilecek özellikte olan GENbox anaer (Biomerieux, France) paketleri kullanıldı. Kâğıt sribin renginin maviden beyaza dönüşmesi durumunda anaerob ortamın oluştuğu dşnld. Stripte renk değişikliği 1-2 saat içinde gözlemlenmediği durumlarda yukarıdaki işlemler tekrarlandı. 48-72 saatlik inkübasyon sonrasında üreyen koloniler incelendi. Hem aerob hemde anaerob ortamda üreme olduysa her iki koloniden Gram boyalı preparat hazırlandı. Her iki ortamda aynı morfolojik yapıda koloniler rediyse fakültatif anaerob bakteri rediđine karar verildi. Yalnızca anaerob ortamda üreyen kolonilerin morfolojik görünümleri incelendi.



Şekil 9. Bazı anaerob bakterilerin Schaedler agar + %5 Sheep Blood besiyerinde kültür görünümleri (Çalışmamamızdan); A- *Prevotella bivia*, B- *Actinomyces naeslundii*, C- *Propionibacterium acnes*, D- *Fusobacterium necrophorum*, E- *Anaerococcus prevotii*, F- *Bacteroides fragilis*

Farklı görünümdeki bütün kolonilerin hem anaerob hemde aerob pasajları yapıldı ve yukarıda belirtilen inkübasyon işlemleri uygulandı. Yalnızca anaerob ortamda üreyen koloniler VITEK 2 (Biomérieux, France) cihazının yardımıyla identifikasyon işlemine alındı.

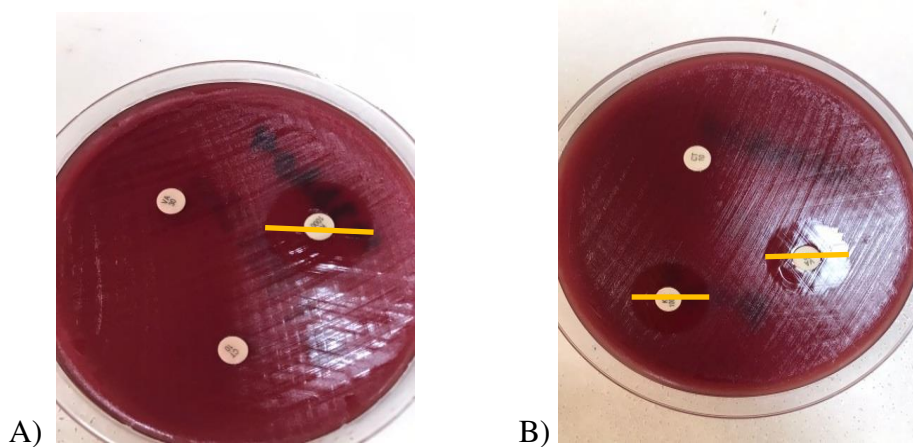
Katı besiyerlerinde anaerob şartlarda bakteri üremediye, Thioglycollate Broth + Resazurin (Biomérieux, France) besiyerine yapılan ekim değerlendirildi. Besiyerinin dip kısmında bulanıklık olduysa anaerob katı besiyerine ve aerob besiyerine pasajları yapıldı ve inkübasyona alındı.



Şekil 10. Anaerop ortamın, metilen mavisi emdirilmiş kâğıt stripler (Merck KGaA, Germany) ile kalite kontrolü (Çalışmamızdan).

3.2.6. İdentifikasyon

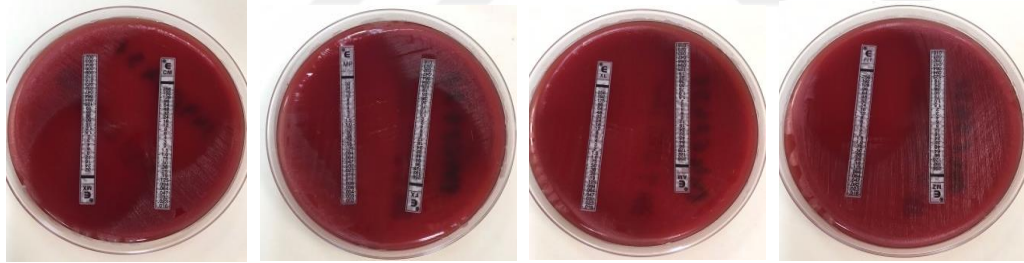
İdentifikasyon için kolistin (10 µg), kanamisin (1000 µg) ve vankomisin (5 µg) diskleri (Bionalyse) kullanıldı. Vitek Densicheck (Biomerieux, France) kullanarak, 1 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlandı. Steril eküvyonla Brucella Blood Agara (Biomerieux, Fransa) sürüldü ve diskler besiyerine yerleştirildi. 48 saat inkübasyondan sonra değerlendirmeye alındı. Zon çapları cetvelle ölçüldü. 10mm üzerinde olan zon çapları hassas (S), 10 mm altında olanlar ise dirençli (R) olarak kabul edildi.



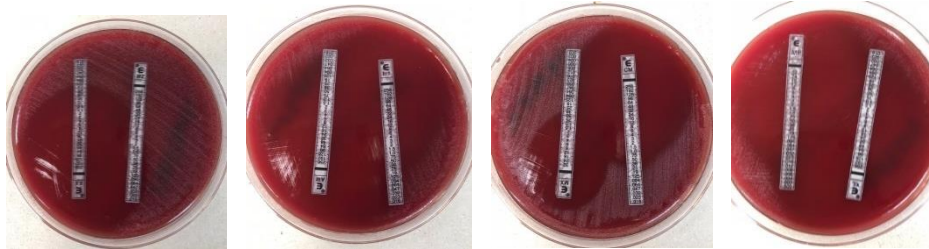
Şekil 11. Disklerle yapılan identifikasyon (Çalışmamızdan). A- Kolistin hassas (22 mm), Kanamisin dirençli, Vankomisin dirençli. B- Kanamisin hassas (16 mm), Vankomisin hassas (19 mm), Kolistin dirençli.

3.2.7. E-Testlerin Yapılması ve Değerlendirilmesi

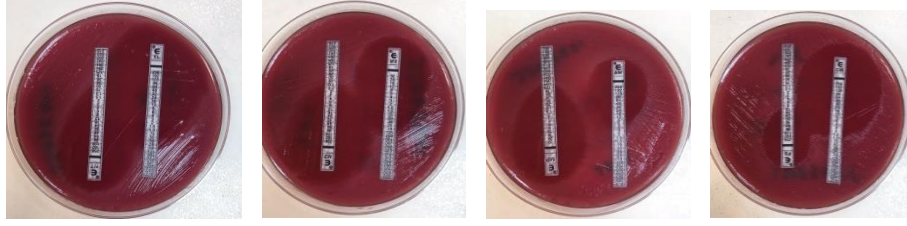
İzole edilen bakterilerin MİK tayini için anaerobik bakteri protokolüne sahip E-Testler (Biomerieux, France) kullanıldı. Çalışmamızda kullanılan E-Testler: ampisillin (AM), sefoksitin (FX) amoksisilin/klavulanik asit (XL), piperasilin/tazobaktam (P/T), meropenem (MP), moksifloksasin (MX), klindamisin (CM) ve metronidazol (MZ). MİK belirlemek için, önce Vitek Densicheck (Biomerieux, France) ile 1 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanmış süspansiyon 15 dakika içinde steril eküvyonla Brucella Blood Agara (Biomerieux, France) 60 derecelik açılarla 3 kez yayıldı. Nemin absorbe olması için plaklar 3-5 dakika beklendikten sonra şeritler 15 dakika içinde besiyerinin üzerine altında hava kabarcığı kalmamasını sağlayarak yerleştirildi. Şeritler kullanmadan önce derin dondurucudan (en az -20⁰ C) çıkarılarak oda ısısına getirildi. Bu işlemler EUCAST'ın 15-15-15 dakika kuralına göre yapıldı. Plaklar, anaerobik bir atmosferde 35 °C'de 48 saat süreyle inkübe edildi. Uygun inkübasyondan sonra tam inhibisyon zonunun E-Test şeridine temas ettiği konsantrasyon (MİK) belirlendi.



Şekil 12. Brucella Broth Agar'da E-Test yöntemi ile *Propionibacter acnes*'in antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi (Çalışmamızdan).



Şekil 13. Brucella Broth Agar'da E-Test yöntemi ile *Actinomyces naeslundii*'nin antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi (Çalışmamızdan)

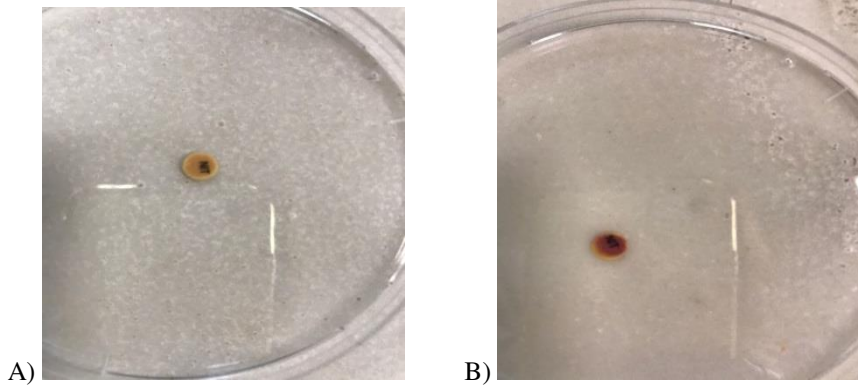


Şekil 14. Brucella Broth Agar'da E-Test yöntemi ile *Bacteroides fragilis*'in antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi (Çalışmamızdan)

Ölçülen MİK değeri, kullanılan standartta (CLCI) yer alan sınır değer tablolarındaki MİK sınır değerleri AM: 0.016-256 µg/mL, XL: 0.016-256 µg/mL, P/T:0.016-256 µg/mL, MP: 0.002-32 µg/mL, MZ: 0.016-256 µg/mL, CM: 0.016-256 µg/mL, MX: 0.002-32 µg/mL, FX: 0.016-256 µg/mL) dikkate alınarak duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak belirlendi.

3.2.8. Nitrocefin Testinin Yapılması

İzole edilen ve tanımlanan tüm anaerob bakteriler, kromojenik Nitrocefin disk yöntemi ile beta-laktamaz üretimi için test edildi. Önce nitrocefin disk (Bioanalyse) 1-2 damla distile su damlatılarak nemlendirildi, sonra besiyerinde üreyen koloniden steril öze ile alınarak diskin üzerine aşılandı. Oda sıcaklığında 10 dakika içerisinde renk değişimi göstermeyen diskler ayrıca 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Sarı renk pembe/kırmızıya döndüğünde test pozitif olarak kabul edilir.



Şekil 15. Nitrocefin disk testi (Çalışmamızdan). A-Nitrocefin disk testi negatif. B- Nitrocefin disk testi pozitif (Sarı renk pembe/kırmızıya dönüşmüş)

4. BULGULAR

Ocak 2021'ten Kasım 2021'e kadar 863 örnekten anaerob kültür istemi yapıldı. Laboratuvarımızda istem yapılan örneklerin tamamına rutin anaerob kültür işlemi yapıldı. Amma anaerob kültür için uygun olan sadece 213 örnek çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan 213 örnekten 22'sinde (%10.3) anaerob bakteri izole edildi: 17 örnekte (%7.98) sadece anaerob bakteri, 5 örnekte (%2.3) hem aerob hem de anaerob bakteri izole edildi. 74 örnekte (%34.7) sadece aerob/fakültatif anaerob bakteri (*Staphylococcus* spp. 32/74, *E.coli* 19/74, *Klebsiella* spp. 11/74, *Streptococcus* spp. 5/74, *Pseudomonas* spp. 3/74, *Enterobacter* spp. 3/74, *Enterococcus* spp. 1/74) üremesi görüldü, 117 örnekte (%54.93) ise üreme görülmeydi. Çalışmada anaerobik bakteriler çoğunlukla apse materyallerinden izole edilmiştir. Kültüre alınan 213 örneğin 164'ü (%77) apse idi ve apse örneklerinin 11'inde (%6.7) anaerobik bakteri izole edildi. Üreme görülen 22 örneğin 11'i (%50) abse örneklerinden olmuştur. Karışık üreme (hem aerob hem de anaerob bakteri) görülen 5 örneğin 4'ü abse örnekleri idi, üreyen aerob bakterilerin iki örnekte *Escherichia coli*, bir örnekte *Proteus mirabilis*, bir örnekte *Staphylococcus epidermidis*, bir örnekte *Enterococcus avium* olduğu gözlemlendi.

Üreyen toplam 22 anaerob bakteri izolatlarının 12'si erkek (%54.5) ve 10'u kadın hastalardan (%45.5) elde edildi. 18 yaş altı hastalardan elde edilen anaerob izolatların sayısı 2 (%9), 18-60 yaş arası 17 (%77.2) ve 60 yaş üstü 3 (%13.6) idi. Anaerob izolatların 6'sı (%27.2) gram negatif, 16'sı (%72.7) gram pozitif (bunlardan 12'si (%54.54) gram pozitif basil, 3'ü (%18.18) gram pozitif kok) idi.

En yaygın izole edilen organizmalar sırasıyla *Propionibacterium/Cutibacterium* türleri (%22.7 n= 5), ardından *Actinomyces* türleri (%18.1 n=4), *Prevotella* türleri (%13.6 n=3), *Bacteroides* türleri (%9 n=2), *Anaerococcus* türleri (%9 n=2), *Clostridium* türleri (%9 n=2) olmuştur.

Mikroskobik inceleme ve antibiyotik disklerle yapılan identifikasyon sonuçları beklenen sonuçlarla uyumluluk gösterdiği gözlemlendi.

Tablo 9. Üreyen bakterilerin hastanın yaşı ve cinsine göre dağılımı

Bakteri	Hastane servisi	Örnek türü	Hastanın cinsi	Hastanın yaşı
<i>Anaerococcus prevotii</i>	Çocuk yenidoğan yoğun bakım	Kan	Erkek	<1
<i>Anaerococcus prevotii</i>	Dahiliye hematoloji servisi	Kan	Erkek	44
<i>Peptoniphilus asaccarolyticus</i>	Beyin cerrahisi servisi	Abse	Kadın	46
<i>Parvimonas micra</i>	Göğüs cerrahisi servisi	Plevral sıvı	Erkek	43
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Genel cerrahi servisi	Kan	Kadın	36
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Nöroloji yoğunbakım	Kan	Kadın	61
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Dahiliye yoğun bakım	Kan	Erkek	64
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Göğüs Hastalıkları polikliniği	Plevral sıvı	Erkek	73
<i>Propionibacterium /Cutibacterium acnes</i>	Beyin cerrahisi servisi	Abse	Erkek	19
<i>Propionibacterium/Cutibacterium acnes</i>	Göz hastalıkları servisi	Kornea	Kadın	20
<i>Propionibacterium/Cutibacterium acnes</i>	Beyin cerrahisi servisi	Abse	Erkek	28
<i>Propionibacterium/Cutibacterium gronulosum</i>	Enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji servisi	Abse	Erkek	30
<i>Propionibacterium /Cutibacterium gronulosum</i>	Dermatoloji polikliniği	Abse	Erkek	28
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Çocuk acil tıp	Kan	Kadın	5
<i>Clostridium group</i>	Covid nöroloji servisi	Kan	Kadın	25
<i>Clostridium subterminale</i>	Beyin cerrahi yoğun bakım	BOS	Kadın	56
<i>Bacteroides fragilis</i>	Genel cerrahi servisi	Abse	Kadın	60
<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>	Kadın hastalıkları ve doğum jinekoloji servisi	Abse	Kadın	56
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Kulak Burun Boğaz servisi	Abse	Erkek	24
<i>Prevotella bivia</i>	Genel cerrahi servisi	Abse	Erkek	39
<i>Prevotella buccae</i>	Acil tıp	Abse	Kadın	44
<i>Prevotella oralis</i>	Genel cerrahi yoğun bakım	Abse	Erkek	57

Tablo 10. Çalışmaya alınan klinik örneklerin türü ve üreyen bakterilerin bu örneklere göre dağılımı

Çalışmaya alınan örnek türü	Çalışmaya alınan örnek sayısı (n)	Sadece anaerob bakteri izole edilen örnek sayısı (n, %)	Sadece aerob/fakültatif anaerob bakteri izole edilen örnek sayısı (n, %)	Miks* üreme görülen örnek sayısı (n, %)
Abse	164	7 (%4.27)	58 (%35.36)	4 (%2.44)
Kan	10	7 (%70)	2 (%20)	-
Plevra sıvısı	12	2 (%16.67)	8 (%66.67)	-
Periton sıvısı	7	-	5 (%71.43)	-
Kornea	16	1 (%6.25)	1 (%6.25)	-
Bos	1	-	-	1(%100)
Perikard sıvısı	3	-	-	-
Toplam	213 (%100)	18(%8.45)	74 (%34.74)	5(%2.35)

Tablo 11. Örnek tiplerine göre anaerob bakterilerin dağılımı

Örnek tipi	<i>Bacteroides</i> spp (n)	<i>Propionibacterium</i> spp (n)	<i>Actinomyces</i> spp (n)	<i>Fusobacterium</i> spp (n)	<i>Clostridium</i> spp (n)	<i>Prevotella</i> spp (n)	<i>Lactobacillus</i> spp (n)	<i>Anaerococcus</i> spp (n)	<i>Parvimonas micra</i> (n)	<i>Peptoniphilus asacharolyticus</i> (n)	Toplam (n)
Abse	2	4	0	1	0	3	0	0	0	1	11
Kan	0	0	3	0	1	0	1	2	0	0	7
Plevral mayi	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2
Kornea	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
BOS	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Toplam	2	5	4	1	2	3	1	2	1	1	22

Tablo 12. Mikroskopik inceleme ve antibiyotik disklerle yapılan identifikasyon sonuçları

Bakteri	Kolistin 10UG (mm)	Kanamisin 100UG (mm)	Vancomisin 5UG (mm)	Örneklerin mikroskopik görünümü
Gram pozitif koklar				
<i>Anaerococcus prevotii</i>	0 (R)	22(H)	20(H)	Gram pozitif kok
<i>Anaerococcus prevotii</i>	0 (R)	16(H)	19 (H)	Gram pozitif kok
<i>Peptoniphilus asaccarolyticus</i>	0 (R)	44(H)	33 (H)	Yoğun PMNL, Gram pozitif kok
<i>Parvimonas micra</i>	0 (R)	20(H)	22 (H)	Bakteri görülmedi
Gram pozitif basiller				
<i>Actinomyces naeslundii</i>	0 (R)	32 (H)	33 (H)	İnce, dallanmış Gram pozitif basil
<i>Actinomyces naeslundii</i>	0 (R)	27 (H)	30 (H)	İnce, dallanmış Gram pozitif basil
<i>Actinomyces naeslundii</i>	0 (R)	40 (H)	35 (H)	İnce, dallanmış Gram pozitif basil
<i>Actinomyces naeslundii</i>	0 (R)	37 (H)	31 (H)	İnce, dallanmış Gram pozitif basil
<i>Propionibacterium/ Cutibacterium acnes</i>	0 (R)	27 (H)	35 (H)	Yoğun PMNL, Gram pozitif basil
<i>Propionibacterium Cutibacterium acnes</i>	0 (R)	30 (H)	40 (H)	Bakteri görülmedi
<i>Propionibacterium/ Cutibacterium acnes</i>	0 (R)	25 (H)	35 (H)	Yoğun PMNL, Gram pozitif basil
<i>Propionibacterium/ Cutibacterium gronulosum</i>	0 (R)	20 (H)	32 (H)	Az miktarda PMNL, Gram pozitif basil
<i>Propionibacterium/ Cutibacterium gronulosum</i>	0 (R)	18 (H)	35 (H)	Az miktarda PMNL, Gram pozitif basil
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0 (R)	22 (H)	0 (R)	Gram pozitif kalın basil
<i>Clostridium group</i>	8 (R)	36 (H)	30 (H)	Gram pozitif kısa basil
<i>Clostridium subterminale</i>	0 (R)	0 (R)	32 (H)	Bakteri görülmedi
Gram negatif basiller				
<i>Bacteroides fragilis</i>	15 (H)	0 (R)	0 (R)	Yoğun PMNL, Gram negatif pleomorfik basiller
<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>	0 (R)	0 (R)	17(H)	Yoğun PMNL, Gram negatif pleomorfik basiller, gram pozitif kok
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	28 (H)	40 (H)	8 (R)	Az miktarda PMNL, Gram negatif basil
<i>Prevotella bivia</i>	0 (R)	0 (R)	0 (R)	Yoğun PMNL, Gram negatif kokobasil
<i>Prevotella buccae</i>	15 (H)	0 (R)	0 (R)	Az miktarda PMNL, Gram negatif kokobasil
<i>Prevotella oralis</i>	0 (R)	0 (R)	0 (R)	Yoğun PMNL, Gram negatif kokobasil

Anaerobik gram-pozitif ve gram-negatif organizmalar için antimikrobiyal duyarlılık testinin sonuçları Tablo 10’da gösterilmiştir.

Ampisillin direnci, farklı izolatlar arasında çeşitli dağılım modelleri göstermiştir. ADT’i yapılan anaerob izolatların ampisillin duyarlılık oranı %59.1 olarak görüldü. Gram pozitif basil ve koklara karşı toplam duyarlılık yüzdesi %81.25 (gram pozitif basiller %91.7, gram pozitif koklara %50), gram negatif anaerob bakterilerin hepsinde (%100) direnç gözlemlendi.

Amoksisillin-klavulanik asit ve Piperasilin-tazobaktam antibiyotiklerinin her ikisi için de %95.5 oranında duyarlılık görüldü, gram pozitif bakterilerin %93.75 (gram pozitif basiller %91.7, gram pozitif koklar %100), gram negatif bakterilerin %100’ü duyarlılık gösterdi.

Meropenem antibiyotiğine %90.9 duyarlılık görüldü. Gram pozitif bakterilerin %87.5’inin (gram pozitif basiller %91.7, gram pozitif koklar %75), gram negatif bakterilerin %100’ünün duyarlı olduğu gözlemlendi.

Metronidazol antibiyotiğine %22.7 duyarlılık görüldü. Direnç esas olarak gram pozitif anaerob bakterilerde (%100) gözlemlendi, gram negatif basillerin çoğuna karşı (%83.3) iyi aktivite göstermiştir.

Klindamisine duyarlılık %77.3 oranında gözlemlendi. Bu oran gram pozitif ve gram negatif izolatlar arasında değişmekte olup, gram pozitif bakterilerin %81.3’ü (gram pozitif basiller %75, gram pozitif koklar %100), gram negatif basillerin %50’si duyarlıdır.

Moksifloksasin duyarlılığı izole edilen anaerob bakterilerin %95.5’inde görüldü. Gram pozitif bakterilerin %93.75’inde (gram pozitif basiller %91.7, gram pozitif koklar %100), gram negatif bakterilerin %100’ünde moksifloksasine duyarlılık izlendi.

Sefoksitine duyarlılık %90.9 oranında görüldü. Gram pozitif bakterilerin %87.5’i (gram pozitif basiller %91.7, gram pozitif koklar %100), Gram negatif bakterilerin %66.7’si duyarlı, %33.3’ü ise orta hassas olarak görüldü.

İzole edilen 4 gram pozitif anaerob koklardan 1’inde β - laktamaz pozitifliği görüldü, %75’i Ampisiline, %75’i Meropeneme duyarlıken, %100’ünde metronidazol direnci belirlendi. Klidamisin, moksifloksasin, sefoksitin, amoksisillin-klavulanik acid, piperasilin-tazobaktam antibiyotiklerine direnç gözlemlenmedi.

ADT yapılan 5 *Cutibacterium* türünün %80’inde klindamisin duyarlılığı belirlenirken, tamamında (%100) metronidazol direnci görüldü. Ampisillin,

meropenem, moksifloksasin, sefoksitin, amoksisilin-klavulanik asit, piperasillin-tazobaktam antibiyotiklerine direnç gözlemlenmedi.

ADT yapılan 4 *Actinomyces* türünün %75'inde Klindamisin duyarlılığı belirlenirken, tamamında (%100) metronidazol direnci belirlendi. Ampisilin, meropenem, moksifloksasin, sefoksitin, amoksisilin-klavulanik asit, piperasillin-tazobaktam antibiyotiklerine direnç gözlemlenmedi.

ADT yapılan 3 *Prevotella* türünün 2'sinde β - laktamaz pozitifliği, %33.3'ünde klindamisin duyarlılığı belirlenirken, tamamında (%100) ampisillin direnci belirlenirken, 1 (%33.33) *Prevotella* türü sefoksitine orta hassas olarak görüldü. Meropenem, metronidazol, moksifloksasin, amoksisilin-klavulanik asit, piperasillin-tazobaktam antibiyotiklerine direnç gözlemlenmedi.

ADT yapılan 2 *Bacteroides* türünün 1'inde β - laktamaz pozitifliği, her ikisinde de (%100) ampisilin direnci görüldü. Sefoksitine, meropenem, metronidazol, moksifloksasin, klindamisin, amoksisilin-klavulanik asit, piperasillin-tazobaktam antibiyotiklerine direnç gözlemlenmedi.

ADT yapılan 2 *Clostridium* türünün her ikisinde de (%100) metronidazol direnci görüldü, *Clostridium subterminale*'de tüm antibiyotiklere direnç gözlemlendi.

Tablo 13. Anaerob bakteriler için CLSI Klinik Sınır Değeri (212)

Antibiyotik	MİC değerleri (µg/mL)		
	S≤	I	R>
Ampisilin	0.5	1	2
Amoksisilin-klavulanik asit	4	8	16
Piperasillin-tazobaktam	16	32	128
Meropenem	4	8	16
Metronidazole	8	16	32
Klindamisin	2	4	8
Moksifloksasin	2	4	8
Sefoksitin	16	32	64

Tablo 14. İzole edilen anaerob bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık profilleri ve β - laktamaz sonuçları

İzole edilen bakteri	Ampisilin ($\mu\text{g/mL}$)	Amoxicillin-clavulanic acid ($\mu\text{g/mL}$)	Piperacillin-tazobactam ($\mu\text{g/mL}$)	Meropenem ($\mu\text{g/mL}$)	Metronidazole ($\mu\text{g/mL}$)	Clindamycin ($\mu\text{g/mL}$)	Moxifloxacin ($\mu\text{g/mL}$)	Cefoxitin ($\mu\text{g/mL}$)	β - laktamaz sonucu
	MİK aralığı 0.016-256 $\mu\text{g/mL}$	MİK aralığı 0.016-256 $\mu\text{g/mL}$	MİK aralığı 0.016-256 $\mu\text{g/mL}$	MİK aralığı 0.002-32 $\mu\text{g/mL}$	MİK aralığı 0.016-256 $\mu\text{g/mL}$	MİK aralığı 0.016-256 $\mu\text{g/mL}$	MİK aralığı 0.002-32 $\mu\text{g/mL}$	MİK aralığı 0.016-256 $\mu\text{g/mL}$	
Gram pozitif anaeroblar									
<i>Anaerococcus prevotii</i> *	8 (R)	1.5 (S)	1.5 (S)	>32 (R)	>256 (R)	0.25 (S)	1.5 (S)	16 (S)	-
<i>Anaerococcus prevotii</i> *	3 (R)	0.75 (S)	0.75 (S)	1.5 (S)	>256 (R)	0.125 (S)	0.125 (S)	12 (S)	+
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	0.023 (S)	0.032 (S)	0.032 (S)	0.012 (S)	>256 (R)	0.047 (S)	0.015 (S)	0.094 (S)	-
<i>Parvimonas micra</i>	0.064 (S)	0.125 (S)	0.047 (S)	0.008 (S)	>256 (R)	0.064 (S)	0.125 (S)	4 (S)	-
<i>Actinomyces naeslundii</i> *	0.032 (S)	0.023 (S)	0.123 (S)	0.004 (S)	>256 (R)	0.25 (S)	0.38 (S)	0.125 (S)	-
<i>Actinomyces naeslundii</i> *	0.064 (S)	0.064 (S)	0.094 (S)	0.023 (S)	>256 (R)	>256 (R)	0.25 (S)	0.125 (S)	-
<i>Actinomyces naeslundii</i> *	0.016 (S)	0.023 (S)	0.064 (S)	0.004 (S)	>256 (R)	0.047 (S)	0.125 (S)	0.032 (S)	-
<i>Actinomyces naeslundii</i> *	0.032 (S)	0.023 (S)	0.064 (S)	0.032 (S)	>256 (R)	0.75 (S)	0.38 (S)	2 (S)	-
<i>Cutibacterium acnes</i> *	0.032 (S)	0.023 (S)	0.125 (S)	0.016 (S)	>256 (R)	0.032 (S)	0.094 (S)	0.19 (S)	-
<i>Cutibacterium acnes</i> *	0.047 (S)	0.047 (S)	0.19 (S)	0.47 (S)	>256 (R)	0.064 (S)	0.125 (S)	0.19 (S)	-
<i>Cutibacterium acnes</i> *	0.047 (S)	0.032 (S)	0.125 (S)	0.008 (S)	>256 (R)	0.19 (S)	0.125 (S)	0.125 (S)	-
<i>Cutibacterium gronulosum</i> *	0.25 (S)	0.025 (S)	1 (S)	0.125 (S)	>256 (R)	>256 (R)	0.047 (S)	0.75 (S)	-
<i>Cutibacterium gronulosum</i> *	0.064 (S)	0.094 (S)	0.047 (S)	0.064 (S)	>256 (R)	0.032 (S)	0.064 (S)	0.19 (S)	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.094 (S)	0.38 (S)	1 (S)	0.094 (S)	>256 (R)	0.016 (S)	1.5 (S)	>256 (R)	-
<i>Clostridium group</i>	0.047 (S)	0.016 (S)	0.016 (S)	0.004 (S)	>256 (R)	0.023 (S)	0.094 (S)	0.047 (S)	-
<i>Clostridium subterminale</i>	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>32 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>32 (R)	>256 (R)	-
Gram negatif anaeroblar									
<i>Bacteroides fragilis</i>	4 (R)	0.19 (S)	0.5 (S)	0.094 (S)	1 (S)	1 (S)	0.125 (S)	12 (S)	-
<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>	>256 (R)	4 (S)	16 (S)	0.38 (S)	0.38 (S)	2 (S)	1 (S)	24 (I)	+
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	>256 (R)	0.125 (S)	0.094 (S)	0.032 (S)	>256 (R)	>256 (R)	0.016 (S)	0.047 (S)	-
<i>Prevotella bivia</i>	>256 (R)	4 (S)	8 (S)	0.125 (S)	0.25 (S)	>256 (R)	0.75 (S)	16 (S)	+
<i>Prevotella buccae</i>	>256 (R)	0.75 (S)	0.5 (S)	0.023 (S)	0.125 (S)	>256 (R)	0.019 (S)	0.5 (S)	+
<i>Prevotella oralis</i>	12 (R)	0.19 (S)	8 (S)	0.125 (S)	0.19 (S)	1.5 (S)	0.5 (S)	24 (I)	-

S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R: Dirençli, n: izolat sayısı * : Antibiyotik duyarlılıkları farklı olduğu için, aynı izolatlar ayrı olarak tabloda belirtilmiştir

Tablo 15. İzole edilen anaerob bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık oranları

Bakteri (n=22)	Gram pozitif ve Gram negatif anaerob bakteriler (n=22) (n,%)	Gram negatif anaerob bakteriler (n=6) (n,%)	Gram pozitif anaerob bakteriler (n=16) (n,%)	Gram pozitif anaerob koklar (n=4) (n,%)	Gram pozitif anaerob basiller (n=12) (n,%)
Antibiyotik					
Ampisilin	13 (%59.1)	0 (%0)	13 (%81.25)	2 (%50)	11 (%91.7)
Amoksisilin-klavulanik asit	21 (%95.5)	6 (%100)	15 (%93.75)	4 (%100)	11 (%91.7)
Piperasilin-tazobaktam	21 (%95.5)	6 (%100)	15 (%93.75)	4 (%100)	11 (%91.7)
Meropenem	20 (%90.9)	6 (%100)	14 (%87.5)	3 (%75)	11 (%91.7)
Metronidazole	5 (%22.7)	5 (%83.3)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Klindamisin	16 (%77.3)	3 (%50)	13 (%81.3)	4 (%100)	9 (%75)
Moksifloksasin	21 (%95.5)	6 (%100)	15 (%93.75)	4 (%100)	11 (%91.7)
Sefoksitin	20 (%90.9)	4 (%66.7)S 2 (%33.3)I	%87.5	4 (%100)	11 (%91.7)

Üreyen anaerob bakterilerin 4'ünde β -laktamaz pozitifliği belirlendi (4/22). β -laktamaz pozitifliği görülen bakterilerden 2'si *Prevotella* spp, 1'i *Anaerococcus* spp, 1'i *Bacteroides* spp idi.

5. TARTIŞMA

Anaerobik bakteriler, insan mikrobiyomunun önemli bir bölümünü oluşturur. Merkezi sinir sistemi (MSS), karın içi ve yabancı cisim enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyonlarda (197, 216), özellikle polimikrobiyal enfeksiyonlarda önemli bir rol oynarlar (10). *Bacteroides*, *Prevotella*, *Propionibacterium*/ *Cutibacterium* türleri ve gram pozitif koklar, klinik örneklerden en sık izole edilen anaerob bakteriler arasındadır (10). Önceki çalışmalarda, enfeksiyon tipine ve hastaneye bağlı olarak izole edilen anaerob bakterilerin ve antimikrobiyal duyarlılığın değişen oranlarda olduğu gösterilmiştir. Bu durum yerel kapsamlı çalışmaların önemini gösteriyor (210, 217-219). Çalışmamızda anaerob kültür yapılan 213 örnekten 6'sı (%27.27) gram negatif, 16'sı (%72.72) gram pozitif (3 anaerobik gram-pozitif kok, 13 anaerobik gram-pozitif basil) olmak üzere toplam 22 (%10.3) anaerob bakteri izole edildi. İzole edilen anaerob bakterilerin 5'i *Cutibacterium* türleri (%22.7), 4'ü *Actinomyces* türleri (%18.1), 3'ü *Prevotella* türleri (%13.6), 2'si *Bacteroides* türleri (%9), 2'si *Anaerococcus* türleri (%9), 2'si *Clostridium* türleri (%9), 1'i *Lactobasillus plantarum*, 1'i *Fusobacterium necrophorum*, 1'i *Peptoniphilus asaccharolyticus*, 1'i *Parvimonas micra* idi.

Anaerob bakterilerle ilgili yapılan az sayıda çalışmada farklı oranlarda anaerob bakteri üremeleri saptanmıştır. Demir ve ark.'nın yaptığı çalışmada 2015-2017 yılları arasındaki üç yıllık dönemde anaerobik kültüre gönderilen n=5535 klinik örnekten 152 (%68) gram-negatif ve 71 (%32) gram-pozitif (35 anaerobik gram-pozitif kok, 36 anaerobik gram-pozitif basil) olmak üzere toplam 223 (%4) anaerob bakteri izole etmişlerdir. Anaerobik gram pozitif basillerin 12'si *Propionibacterium* / *Cutibacterium acnes*, 5'i *Actinomyces* spp ve 3'ü *Clostridium* spp. olmuştur (220). Özcan ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise anaerob bakteriler 368 klinik örneğin 73 (%19.8)'ünden izole edilmiş; bu örneklerin 50 (%13.6)'sinde sadece anaerob, 23 (%6.3)'ünde ise anaerob bakterilerin yanı sıra aerob/fakültatif anaerob etkenler izole edilmiştir (221). Doğan ve ark.'nın, Konya'da 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada da 100 klinik örneğin 14'ünden (%14) toplam 22(%22) anaerob bakteri izolasyonu yapılmış, bu örneklerin 7'sinde aynı anda birden fazla anaerob bakteri saptanırken, 8 örnekte anaerob ve fakültatif anaerob bakterilerin birlikte ürediği gözlenmiştir. İzole edilen toplam 22 anaerob suş; *Bacteroides fragilis* (n= 6), *B. fragilis* dışı *Bacteroides* spp. (n= 2), *Bacteroides caccae*

(n= 2), *Clostridium* spp. (n= 2), *Fusobacterium necrophorum/nucleatum* (n= 1), *Prevotella intermedia/disienis* (n= 1), *Peptococcus niger* (n= 2), *Peptostreptococcus* spp. (n= 5) ve *Lactobacillus acidophilus/lensenii* (n= 1) olarak tanımlanmıştır. Çalışmada, 6 *B.fragilis* izolatından 2'sinin beta-laktamaz enzimi ürettiği saptanmış diğer anaerob suşlarda beta-laktamaz varlığı tespit edilmemiştir (222). Uysal ve ark. yaptığı çalışmada çalışılan örneklerin 409'unda (%75,3) üreme görülmezken, 134 örnekte (%24,6) çeşitli anaerob bakteriler üretilmiştir. Üreme saptanan 134 örneğin 74'ünde (%55.2) hem aerob hem de anaerob bakteriler ürerken, 60 örnekten (%44.7) sadece anaerob bakteriler izole edilmiştir. Çalışmada izole edilen anaerob bakteriler arasında da en fazla üreyen bakterinin *Bacteroides* spp. (%29,9) olduğu görülürken, ikinci sırada *Peptostreptococcus* spp. (%23,1), üçüncü sırada *Propionibacterium* spp. (%20,2) izole edilmiştir (223). Kiremitçi ve ark. tarafından Eskişehir Osmangazi Üniversitesinde 2007-2008 yılları arasında yürütülen bir tez çalışmasında 14 aylık bir süre içinde 241 klinik örneğin 31 (%12.9)'inden anaerob bakteriler, 17 (%7)'sinden anaerob ve aerob bakteriler izole edilmiştir (224). Bacalan ve ark yaptığı çalışmada ise örneklerin %6,6'sında sadece anaerobik bakteri üremesi gözlemlenirken, örneklerin % 1,5'inde hem anaerobik hem de aerobik bakteri üremesi olmuştur. Çalışmada *Cutibacterium* türleri %27,5 oranı ile en sık izole edilen anaerobik bakteri olduğu gözlemlendi (225). Boyanova ve ark.'nın çalışmalarında abse örneklerinde izole edilen toplam 174 anaerob bakteriden *Prevotella* türleri (%22 n=49) en sık izole edilen bakteri idi (226). Wybo ve ark. yaptığı çalışmada *Bacteroides* ve *Parabacteroides* spp. izolatların %45'ini, *Fusobacterium* spp. %5, *Prevotella* spp. ve diğer gram negatif basiller %13, *Clostridium* spp. %9, spor oluşturmayan gram pozitif basiller %10 ve anaerobik koklar %18'ini oluşturmaktadır (227). Erciş ve ark. hem aerobik hem de anaerobik üreme oranını %20,5 ve sadece anaerobik üreme oranını %7,6 olarak bildirmiştir (228). Doğan ve ark., Uysal ve ark. ve Wybo ve ark. yaptığı çalışmada *Bacteroides* türlerinin en sık etken olarak tespit edilmesinin nedeni intraabdominal örnek sayısının daha fazla olması ile ilişkilendirilmiştir.

Çalışmamızda anaerobik bakteriler çoğunlukla apse materyallerinden izole edilmiştir. Kültüre alınan 213 örneğin 164'ü (%77) apse idi ve apse örneklerinin 11'inde (%6.7) anaerobik bakteri izole edildi. Üreme görülen 22 örneğin 11'i (%50) abse, 7'si (%31.8) kan, 2'si (%9.1) plevral sıvı örneklerinden olmuştur. Bakterilerin izolasyon

materyallerinin araştırıldığı farklı çalışmalarda da bizim çalışmamızla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bacalan ve ark yaptığı çalışmada kültürü yapılan 800 örneğin 228'i apse idi ve apse örneklerinin 50'sinden (%21.9) anaerobik bakteri izole edildi. Apse örneklerinin 7'sinde (%3) sadece anaerobik bakteriler ürerken, 43'ünde (%18,9) hem anaerobik hem de fakültatif anaerobik bakteriler üremiştir (225). Uysal ve ark. yaptığı çalışmada en fazla anaerob bakteri üretilen örnek grubu apse örnekleri olmuştur. Üreme saptanan 134 örneğin 168 (% 30,9)'i apse olup, izole edilen anaerob bakteri sayısı 60 (% 11,1) idi (223). Doğan ve ark., çalışmada anaerob bakteri izolasyonu gözlemlenen 14 örneğin 8'inin (%57.1) apse olduğunu belirtmişlerdir (222). Cobo ve ark. tarafından yapılan çalışmada 243 anaerob bakterilerin 78'i (%32) apse numunesinden, 43'ü (%17.7) doku/yara örneğinden, 18'i (%7.4) kan örneğinden, 8'i (%3.3) plevra sıvısından ve geri kalan bakteriler ise diğer örneklerden izole edilmiştir (229). Jeverica ve ark. yaptığı çalışmada 2673 anaerob bakteri izole edilmiştir. Bu bakterilerden 1568'i (% 57) deri ve yumuşak doku bölgelerinden, 529'u (% 21) abdominal bölgeden, 131'i (% 5) baş ve boyun bölgelerinden, 113'ü (% 4) kan kültüründen, 103'ü (% 4) ürogenital bölgeden, 84'ü (% 3) kemik ve eklem bölgelerinden ve geriye kalan bakteriler ise vücudun diğer anatomik bölgelerinden izole edilmiştir (230).

Anaeroblarda antibiyotik direncinin prevalansı artmaktadır, bu da hem antibiyotik tedavisini hem de hasta mortalitesini etkilemektedir. Anaerobik enfeksiyonların ampirik tedavisinde bölgesel duyarlılık modelleri çok önemlidir. Anaerobik bakterilerin direnç eğilimleri bölgeler veya kurumlar arasında büyük ölçüde değişebileceğinden, anaerobik enfeksiyonların ampirik antimikrobiyal tedavisine yardımcı olmak için antimikrobiyal duyarlılık testleri (ADT) yapılmalıdır (94, 231).

Çalışmamızda ADT çalışılan anaerob bakteriler Metronidazol antibiyotiğine %22 duyarlılık gösterdi. Direnç esas olarak Gram pozitif anaerob bakterilerde (%100) gözlemlendi, Bu durum *Actinomyces*, *Propionibacterium/ Cutibacterium* ve *Lactobacillus* türleri başta olmak üzere spor oluşturmeyen gram-pozitif anaerob basillerin çoğunda bulunan intrinsek direncin göstergesidir. Gram-negatif basillerin çoğuna karşı (%83.3) iyi aktivite göstermiştir.

Metronidazole direnç, Avrupa'da ve ülkemizin diğer bölgelerinde düşük oranlarda bildirilirken, Van ve Dicle'de belirlenen yüksek oranlar dikkat çekmektedir. Gajdacs ve ark. yaptığı çalışmada, anaerob bakterilerle ilgili gerek Avrupa gerekse

Amerika’da gram pozitif kok ve gram negatif basillerde metronidazol direncinin oldukça düşük ($< \%1$) olduğunu bildirmiştir (10). Badr ve ark. Almanya’da yaptığı çalışmada metronidazol, hem gram pozitif (%94,5) hem de gram negatif basiller (%97,3) arasında çoğu anaerobik izolata karşı iyi aktivite göstermiştir (232). Boyanova ve ark.’ yaptığı çalışmada gram negatif anaerobların klindamisin ve metronidazole direnç oranları sırasıyla %5.4 ve %2.5, gram pozitif türlerinki ise sırasıyla %4.5 ve %58.3 idi. (226). Wybo ve ark. yaptığı çalışmada metronidazole %92 duyarlılık belirlendi (227). Cobo ve ark. yaptığı çalışmada gram pozitif anaerob kokların metronidazole direnci %12, Gram pozitif anaerobik basillerin metronidazol direnci %77, Gram negatif anaerobik basillerin metronidazol direnci %50 olarak bulundu (229). Ishak ve ark. yaptığı çalışmada gram pozitif anaerob bakterilerin metronidazole duyarlılığı %48.9, gram negatif anaerob bakterilerin duyarlılığı ise %96 olarak bildirildi (233). Naidoo ve ark. yaptığı çalışmada anaerob bakterilerin metronidazol duyarlılığı %89.4 olarak bildirildi (234). Türkiye’de bildirilen metronidazole direnç oranları ise değişkenlik göstermektedir. Özcan ve ark. Dicle’de 65 anaerob bakteri (26 gram-pozitif basil, 18 gram pozitif kok) izolatını dahil ettiği çalışmalarında gram pozitif basillerin %96.2’sinde, gram pozitif kokların %61.1’inde metronidazole direnç bildirmiştir. Bu çalışmaya dahil edilen 21 gram negatif anaerob izolatında metronidazol direnci %33.3 olarak belirlenmiştir (221). Bozkurt ve ark. Van’da 39 anaerob (26’sı gram-pozitif basil) izolatın dahil edildiği çalışmada metronidazole direnç %94.9 ile en yüksek oranda bildirilmiştir (235). Demir ve ark. Afyon’da 28 gram negatif anaerob bakteri izolatın test ettiği çalışmada ise tüm izolatların metronidazole duyarlı olduğu bildirilmiştir (220).

Çalışmamızda ADT’i yapılan anaerob izolatların ampisillin duyarlılık oranı %59.1 olarak görüldü. Gram pozitif bakterilerin toplam duyarlılık yüzdesi %81.25 (gram pozitif basiller %91.7, gram pozitif koklar %50), gram negatif anaerob bakterilerin hepsinde (%100) direnç gözlemlendi. Çalışmamızda, Türkiye’de ve yurtdışında yapılan çalışmaların sonuçlarına yakın veriler gözlemlendi. Özcan ve ark. yaptığı çalışmada gram pozitif basillerin %30.8’inde, gram pozitif kokların %50’sinde, gram negatif basillerin %76.2’sinde penisilline direnç bildirmiştir (221). Jeverica ve ark. yaptığı çalışmada genel olarak, penisilline %19 direnç bulundu. GPAC’ler arasında penisilline direnç nadirdi (%2) (230). Wybo ve ark. yaptığı çalışmada tüm izolatlar

penisilline %40 duyarlılık belirlenirken, gram pozitif anaerob koklar için %81 duyarlılık görüldü (227). Ishak ve ark. yaptığı çalışmada gram pozitif anaerob bakterilerin ampisiline duyarlılığı %76.7, gram negatif anaerob bakterilerin duyarlılığı ise %32 olarak bildirildi (233). Cobo ve ark. yaptığı çalışmada gram pozitif anaerob kokların penisillin direnci %6.2, gram pozitif anaerobik basillerin penisillin direnci bildirilmemişken(%0), gram negatif anaerobik basillerin penisillin direnci %33.3 olarak bulunmuştur (229). Naidoo ve ark yaptığı çalışmada ise penisilin duyarlılığı %33.3 olarak belirlenmiştir (234).

Demir ve ark çalışmalarında ise gram negatif bakterilerin penisillin direnci %78.57 olarak bildirilmiştir (220).

Hemen hemen bütün çalışmalarda, çalışmamıza uyumlu olarak, amoksisilin-klavulanik asit ve piperasilin-tazobaktam anaerob bakterilere karşı en duyarlı antibiyotikler olarak bildirilmiştir (219, 220, 227, 229, 230, 234).

Yapılan çalışmalarda klindamisin duyarlılık oranlarında değişkenlikler gözlemlenmiştir. Çalışmamızda klindamisine duyarlılık %77.3 oranında görüldü. Gram pozitif bakterilerin %81.3'ü (gram pozitif basiller %75, gram pozitif koklar %100), gram negatif basillerin %50'si duyarlıdır. Bu sonuçlarımız bazı çalışma sonuçları ile (227, 230, 234) uyum gösterirken bazı çalışma sonuçlarına kıyasla daha düşük duyarlılık gösterdi (226,232). Cobo ve ark. yaptığı çalışmada gram pozitif anaerob kokların klindamisine direnci %56, gram pozitif anaerobik basillerin ise %38 iken gram negatif anaerobik basillerin % 16'sı klindamisine dirençli bulunmuştur (229). Çalışmamızda gram pozitif bakterilerin duyarlılık oranları daha yüksek bulunurken, gram negatif bakterilerde bu oran daha düşük bulundu.

Çalışmamızda meropenem antibiyotiğine %90.9 duyarlılık görüldü. Gram pozitif bakterilerin %87.5'inin (gram pozitif basiller %91.7, gram pozitif koklar %75), gram negatif bakterilerin %100'ünün duyarlı olduğu gözlemlendi. Yurt içi ve yurt dışında yapılan çalışmalarda da (219, 220, 227, 238) çalışmamızdaki sonuçlarla uyumlu olarak meropeneme iyi aktivite oranları görülmüştür.

Çalışmamızda moksifloksasin duyarlılığı izole edilen anaerob bakterilerin %95.5'inde görüldü. Gram pozitif bakterilerin %93.75'inde (gram pozitif basiller %91.7, gram pozitif koklar %100), gram negatif bakterilerin %100'ünde moksifloksasine duyarlılık izlendi. Yurt dışında yapılan çalışmalarda (219, 227, 229,

232,238) çalışmamızdan farklı olarak moksifloksasine daha düşük oranda duyarlılıklar gösterilmiştir. Türkiyede Demir ve ark yaptığı çalışmada (220) izole edilen gram negatif anaerob bakterilerin moksifloksasin'e duyarlılığının %100 olduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla uyum göstermektedir.

Çalışmamızda sefoksitine duyarlılık %90.9 oranında görüldü. Gram pozitif bakterilerin %87.5'i (gram pozitif basiller %91.7, gram pozitif koklar %100), gram negatif bakterilerin %66.7'si duyarlı, %33.3'ü ise orta hassas olarak görüldü. Yapılan yurt içi ve yurt dışı çalışmalar incelendiğinde, bu bakteri grubunda birbirinden oldukça farklı oranlarda (%3-89) sefoksitin direnci tespit edilmiştir (220, 221, 227, 234, 236, 237).



6. SONUÇLAR

Özetle, bu çalışmada anaerob bakterilerde özellikle metronidazole %77,3 ve ampisilline %40.9 oranında endişe verici bir direnç gözlemlenmiştir. Bu direncin mortalite ile ilişkisi ve daha önce anti-anaerobik ajanların kullanımı gibi diğer risk faktörleri araştırılmamıştır. Bunların gelecekte değerlendirilmesi önemli olabilir. Ayrıca, hastalar ve halk sağlığı üzerindeki etkisini anlamak için anaeroblarda antimikrobiyal direncin sonuçlarının da incelenmesi gerekmektedir. Anaeroblarda ortaya çıkan ilaç direnci nedeniyle, yönetim için daha yeni ve alternatif seçeneklerin de araştırılması yararlı olacaktır. Anaerobların duyarlılık testinin rutin bir hizmet olmasının zamanı gelmiştir. Bu veriler, direncin izlenmesinde ve yerel antibiyogram oluşturulmasında yardımcı olabilir ve direnç eğiliminin periyodik gözetimi için kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. **Itzhak Brook.** Anaerobic infections in children. *Adv Exp Med Biol.* **2011**; 697:
2. **Finegold S.M. George W.L.** Anaerobic infections in humans. Elsevier, , San Diego**2012**: 37-53.
3. **Lassmann B, Gustafson DR, Wood CM, Rosenblatt JE.** Reemergence of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis.* **2007**;44(7):895–900.
4. **Fenner L, Widmer AF, Straub C, Frei R.** Is the incidence of anaerobic bacteremia decreasing? Analysis of 114,000 blood cultures over a ten-year period. *J Clin Microbiol.* **2008**;46(7):2432–4.
5. **Lee DJ.** Clinical significance of anaerobic infections. *Korean J Intern Med* **2009**; 24:11–12.
6. **Stevens DL, Aldape MJ, Byrant AE.** Life-threatening clostridial infections. *Anaerobe* **2012**; 18:254–9.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved standard.* 8th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; **2012.** M11-A8.
8. **Brook I, Wexler HM, Goldstein EJ.** Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* **2013**;26:526–546.
9. **Nagy E, Urbán E, Nord CE and ESCMID.** Study Group of Anaerobic Infections. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin Microbiol Infect* **2011**;17:371–9.
10. **Gajdács M, Spengler G, Urbán E.** Identification and antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: Rubik's cube of clinical Microbiology? *Antibiotics* **2017**;6:e25.
11. **Nagy E.** Anaerobic infections: update on treatment considerations. *Drugs* **2010**; 70: 841–58.
12. **Tran CM, Tanaka K, Watanabe K, Tanaka K, Watanabe K.** PCR-based detection of resistance genes in anaerobic bacteria isolated from intra-abdominal infections. *J Infect Chemother* **2013**;19:279–90.
13. **Sóki J, Hedberg M, Patrick S, Bálint B, Herczeg R, Nagy I.** Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates. *J Antimicrob Chemother* **2016**;71:2441–8.
14. **Urbán E, Horváth Z, Sóki J, Lázár G.** First Hungarian case of an infection caused by multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* strain. *Anaerobe* **2015**;31:55–8.
15. **Brook I.** Treatment of anaerobic infection. *Expert Rev Anti Infect Ther***2007**; 5: 991–1006.
16. **Winn WC, Koneman EW, Allen SD, Procop GW, Janda WM, Schreckenberger PC, et al.** The Anaerobic Bacteria. *Konemans Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2006**: 877-944.
17. **Gürler, N.** Anaerob infeksiyonlara genel bakış ve antimikrobiyallere direnç durumu. *Aknem Derg.* (2001) 15 (No.3): 593-599.
18. **Zubkov M.N.** Klinik Mikrobiyoloji ve Antimikrobiyal Kemoterapi. **2005**; 7(4):312-322.

19. Jousimies-Somer, H. R., Summanen, P., Citron, D. M., Baron, E. J., Wexler, H. M., & Finegold, S. M. Introduction to anaerobic Bacteriology. Anaerobic Bacteriology Manual, 6th Edn, Wadsworth-KTL, Star Publishing Co., Los Angeles, Ca, pp1-21. :2002.
20. Endo A, Pärtty A, Kalliomäki M, Isolauri E, Salminen S. Long-term monitoring of the human intestinal Microbiota from the 2nd week to 13 years of age. *Anaerobe*. **2014** Aug;28:149-56.
21. Engerlkrik PG, Engerlkirk JD. Anaerobes of Clinical Importance. Textbook of Diagnostic Microbiology. 3rd ed. St. Louis: Sanders Elsevier; **2007**, p:587-664.
22. Kononen E, Wade WG, Citron DM. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other anaerobic gram-negative rods. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of clinical Microbiology*. 10th ed. Washington, DC: ASM Press; **2011**. pp. 858–880.
23. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Ruthazer R, Golan Y, Goldstein EJ, et al. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother*. **2007**;51:1649–1655.
24. Park Y, Lee Y, Kim M, Choi JY, Yong D, Jeong SH, et al. Recent trends of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens and clinical characteristics of anaerobic bacteremia. *Infect Chemother*. **2009**;41:216–223.
25. Bakir MA, Kitahara M, Sakamoto M, Matsumoto M, Benno Y. *Bacteroides finegoldii* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. **2006**;56(Pt 5):931–935.
26. Bakir MA, Kitahara M, Sakamoto M, Matsumoto M, Benno Y. *Bacteroides intestinalis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. **2006**;56(Pt 1):151–154.
27. Bakir MA, Sakamoto M, Kitahara M, Matsumoto M, Benno Y. *Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. **2006**;56(Pt 7):1639–1643.
28. Simmon KE, Mirrett S, Reller LB, Petti CA. Genotypic diversity of anaerobic isolates from bloodstream infections. *J Clin Microbiol*. **2008**;46:1596–1601.
29. Song YL, Liu CX, McTeague M, Finegold SM. "*Bacteroides nordii*" sp. nov. and "*Bacteroides salyersae*" sp. nov. isolated from clinical specimens of human intestinal origin. *J Clin Microbiol*. **2004**;42:5565–5570.
30. Kim MS, Roh SW, Bae JW. *Bacteroides faecis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. **2010**;60(Pt 11):2572–2576.
31. Cerdeno-Tarraga AM, Patrick S, Crossman LC, Blakely G, Abratt V, Lennard N, Poxton I, Duerden B, Harris B, Quail MA. et al. Extensive DNA inversions in the *B. fragilis* genome control variable gene expression. *Science*. **2005**;307:1463–1465. doi: 10.1126/science.1107008.
32. Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev*. **2007**;20:593–621. doi: 10.1128/CMR.00008-07.
33. Robertson KP, Smith CJ, Gough AM, Rocha ER. Characterization of *Bacteroides fragilis* hemolysins and regulation and synergistic interactions of HlyA and HlyB. *Infect Immun*. **2006**;74:2304–2316. doi: 10.1128/IAI.74.4.2304-2316.2006.
34. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal Microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2010**;107:12204–9. 10.1073/pnas.0909122107.

35. **Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, Kwon AHK, Vasconcelos AC, Cunha LD, et al.** Gene-Microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science*. **2016**;352:1116–20. 10.1126/science.aad9948.
36. **Wexler HM.** Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clin Microbiol Rev*. **2007**;20:593–621. 10.1128/CMR.00008-07.
37. **Rhee K-J, Wu S, Wu X, Huso DL, Karim B, Franco AA, et al.** Induction of Persistent Colitis by a Human Commensal, Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in Wild-Type C57BL/6 Mice. *Infect Immun*. **2009**;77:1708–18. 10.1128/IAI.00814-08.
38. **Sears CL.** Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a Rogue among Symbiotes. *Clin Microbiol Rev*. **2009**;22:349–69. 10.1128/CMR.00053-08.
39. **Pierce JV, Bernstein HD.** Genomic Diversity of Enterotoxigenic Strains of *Bacteroides fragilis*. *PLoS ONE*. **2016**;11:e0158171 10.1371/journal.pone.0158171.
40. **Housseau F. and Sears CL.** Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF)- mediated colitis in Min (Apc+/-) Mice: A human commensal-based murine model of colon carcinogenesis. *Cell Cycle*. **2010**; 9 (1): 3–5.
41. **Filippis FD, Pasolli E, Tett A, Tarallo S, Naccarati A, Angelis MD, et al.** Distinct Genetic and Functional Traits of Human Intestinal *Prevotella copri* Strains Are Associated with Different Habitual Diets. *Cell Host Microbe*. **2019**;25: 444–453.e3. 10.1016/j.chom.2019.01.004.
42. **Tremaroli V, Bäckhed F.** Functional interactions between the gut Microbiota and host metabolism. *Nature*. **2012**;489(7415):242–249.
43. **Shen J, Obin MS, Zhao L.** The gut Microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med*. **2013**;34(1):39–58.
44. **Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Goldstein EJ, Harrell L, Jenkins S, et al.** **2011.** Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006–2009. *Anaerobe*17:147–151.
45. **Kalapila A, Pergam S, Pottinger P, Butler-Wu S, and Whimbey E.** 2013. Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*, Seattle, Washington, **2013**. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*62:694–696.
46. **Soki J, Hedberg M, Patrick S, Balint B, Herczeg R, Nagy I, Hecht DW, Nagy E, and Urban E.** **2016.** Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates. *J Antimicrob Chemother*71:2441–2448.
47. **Zhao J-S, Manno D & Hawari J.** *Psychrilyobacter atlanticus* gen. nov., sp. nov., a marine member of the phylum Fusobacteria that produces H₂ and degrades nitramine explosives under low temperature conditions. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 59, 491–497 (**2009**).
48. **Manson McGuire A et al.** Evolution of invasion in a diverse set of *Fusobacterium* species. *MBio* 5, e01864 (**2014**).
49. **Caitlin A. Brennan and Wendy S. Garret.** *Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and oncobacterium *Nat Rev Microbiol*. **2019** Mar; 17(3): 156–166.
50. **Goldberg EA, Venkat-Ramani T, Hewit M, Bonilla HF:** Epidemiology and clinical outcomes of patients with *Fusobacterium* bacteraemia. *Epidemiol Infect*. **2012**, 141: 325-329.
51. **Riordan T:** Human infection with *Fusobacterium necrophorum* (Necrobacillosis), with a focus on Lemierre’s syndrome. *Clin Microbiol Rev*. **2007**, 20: 622-659. 10.1128/CMR.00011-07.

52. **Jensen A, Hagelskjaer Kristensen L, Prag J:** Detection of *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* in tonsillitis in young adults by real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* **2007**, 13: 695-701. 10.1111/j.1469-0691.2007.01719.x.
53. **Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S & Jakubovics NS.** Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat. Rev. Microbiol* 8, 471–480 (2010).
54. **Swidsinski A, Dörffel Y , Loening-BauckeV, TheissigF, Rückert J, Ismail M, Rau W.A. Gaschler D, Weizenegger M, KühnS, Schilling J, Dörffel.D.** Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut* 60, 34–40 (2011).
55. **Xiang Y Han , Jeffrey S Weinberg, Sujit S Prabhu, Samuel J Hassenbusch, Gregory N Fuller, Jeffrey J Tarrand, Dimitrios P Kontoyiannis.** *Fusobacterial* brain abscess: a review of five cases and an analysis of possible pathogenesis. *J. Neurosurg* 99, 693–700 (2003).
56. **Gregory S.W., Boyce T.G, Larson A.N., Patel R. & Jackson M.A.** *Fusobacterium nucleatum* osteomyelitis in 3 previously healthy children: a case series and review of the literature. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc* 4, e155–e159 (2015).
57. **Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR & Dutilh BE .** A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat. Rev. Microbiol* 10, 575–582 (2012).
58. **Strauss J , Kaplan G., Beck Paul L, Rioux K , Panaccione R, Devinney R, LynchT, Allen-VercoeE.** Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflamm. Bowel Dis* **2011** Sep;17(9):1971-8. doi: 10.1002/ibd.21606.
59. **Ikegami A, Chung P & Han YW.** Complementation of the *fadA* mutation in *Fusobacterium nucleatum* demonstrates that the surface-exposed adhesin promotes cellular invasion and placental colonization. *Infect. Immun* 77, 3075–3079 (2009).
60. **Gursoy UK, Könönen E & Uitto V-J.** Intracellular replication of *fusobacteria* requires new actin filament formation of epithelial cells. *APMIS* 116, 1063–1070 (2008).
61. **Aagaard K, Jun Ma , Antony M. K. , Ganu R, Petrosino J , Versalovic J .** The placenta harbors a unique Microbiome. *Sci. Transl Med* 6, 237ra65 (2014).
62. **Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, et al.** Gut Microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* **2010**; 5:e9085.
63. **Takahashi N.** Microbial ecosystem in the oral cavity: metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *Int Congr Ser* **2005**; 1284:103–12.
64. **Di Cicco M, Pistello M, Jacinto T, et al.** Does lung Microbiome play a causal or casual role in asthma? *Pediatr Pulmonol* **2018**; 53:1340–5.
65. **Larsen JM.** The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology* **2017**; 151:363–74.
66. **De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, et al.** Impact of diet in shaping gut Microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* **2010**; 107:14691–6.
67. **Si J, You HJ, Yu J, Sung J, Ko GP.** *Prevotella* as a hub for vaginal microbiota under the influence of host genetics and their association with obesity. *Cell Host microbe* **2017**; 21:97–105.
68. **Balle C, Lennard K, Dabee S, et al.** Endocervical and vaginal Microbiota in South African adolescents with asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infection. *Sci Rep* **2018**; 8:11109.

69. **Masson L, Barnabas S, Deese J, et al.** Inflammatory cytokine biomarkers of asymptomatic sexually transmitted infections and vaginal dysbiosis: a multicentre validation study. *Sex Transm Infect* **2019**; 95:5–12.
70. **Baldwin EA, Walther-Antonio M, MacLean AM, et al.** Persistent Microbial dysbiosis in preterm premature rupture of membranes from onset until delivery. *PeerJ* **2015**; 3:e1398.
71. **Renz H, von Mutius E, Brandtzaeg P, Cookson WO, Autenrieth IB, Haller D.** Gene–environment interactions in chronic inflammatory disease. *Nat Immunol* **2011**; 12:273–7.
72. **Geva-Zatorsky N, Sefik E, Kua L, Pisman L, Tan TG, Ortiz-Lopez A et al.** Mining the human gut Microbiota for immunomodulatory organisms. *Cell* **2017**; **168**:928–43.
73. **Zhu A, Sunagawa S, Mende DR, Bork P.** Inter-individual differences in the gene content of human gut bacterial species. *Genome Biol* **2015**; **16**:82.
74. **James CE, Hasegawa Y, Park Y, et al.** LuxS involvement in the regulation of genes coding for hemin and iron acquisition systems in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* **2006**;74(7):3834–3844.
75. **Kuboniwa M, Amano A, Hashino E, et al.** Distinct roles of long/short fimbriae and gingipains in homotypic biofilm development by *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol.* **2009**;9:105.
76. **Maeda K, Tribble GD, Tucker CM, et al.** A *Porphyromonas gingivalis* tyrosine phosphatase is a multifunctional regulator of virulence attributes. *Mol Microbiol.* **2008**;69(5):1153–1164.
77. **Yilmaz O.** The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the Mikrobium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology.* **2008**;154(Pt 10):2897–2903.
78. **Otomo-Corgel J, Pucher JJ, Rethman MP, Reynolds MA.** State of the science: chronic periodontitis and systemic health. *J Evid Based Dent Pract.* **2012**;12(Suppl. 3):S20–S28.
79. **Koren O, Spor A, Felin J, et al.** Human oral, gut, and plaque Microbiota in patients with atherosclerosis. *Natl Acad Sci USA.* **2011**;108(Suppl. 1):S4592–S4598.
80. **Skamagas M, Breen TL, LeRoith D.** Update on diabetes mellitus: prevention, treatment, and association with oral diseases. *Oral Dis.* **2008**;14(2):105–114.
81. **Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, et al.** The American journal of cardiology and journal of periodontology editors' consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *Periodontol.* **2009**;80(7):1021–1032.
82. **Nakano K, Inaba H, Nomura R, et al.** Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiol Immunol.* **2008**;23(2):170–172.
83. **Saito A, Inagaki S, Kimizuka R, et al.** *Fusobacterium nucleatum* enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **2008**;54(3):349–355.
84. **Inaba H, Kuboniwa M, Bainbridge B, et al.** *Porphyromonas gingivalis* invades human trophoblasts and inhibits proliferation by inducing G1 arrest and apoptosis. *Cell Microbiol.* **2009**;11(10):1517–1532.
85. **Silva S, Venceslau S, Fernandes C, Valente F, Pereira I.** **2008.** "Hydrogen as an energy source for the human pathogen *Bilophila wadsworthia*". *Antonie van Leeuwenhoek*. 93:381–390.

86. Gerardo M Nava , Franck Carbonero, Jennifer A Croix, Eugene Greenberg, H Rex Gaskins. Abundance and diversity of mucosa-associated hydrogenotrophic Microbes in the healthy human colon. *ISME J.* **2012**; **6** :57-70.
87. Yazici C , Wolf G P , Kim H, Cross L. T., Vermillion K , Carroll T , at.all Race-related association of sulfidogenic bacteria with colorectal cancer. *Bowel.* **2017**; **66** :1983–1994.
88. Feng Z, Long W, Hao B, Ding D, Ma X, Zhao L & Pang X.A human stool-derived *Bilophila wadsworthia* strain caused systemic inflammation in specific-pathogen-free mice. **2017**; **9** : 59.
89. Devkota S , Wang Y, Musch M. W , Leone V, Fehlner-PeachH, Nadimpalli A, Antonopoulos D.A. , Jabri B, Chang E.B. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10^{-/-} MfKe. *Nature.***2012**; **487** :104–108.
90. Murphy EC, Frick IM. Gram-positive anaerobic cocci-commensals and opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **2013**; **37**(4): 520-53.
91. Tunçkanat F. Anaerop bakterilerin genel özellikleri, pp: 2319-63. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2. **2008**, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
92. Song Y, Liu C, Finegold SM. Development of a flow chart for identification of gram-positive anaerobic cocci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* **2007**; **45**(2): 512-6.
93. Brook I, Wexler MH, Ellie JC, Goldstein EJC. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* **2013**; **26**(3): 526-46.
94. Schuetz AN. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* **2014**; **59**(5): 698-705.
95. Ulger-Toprak N, Liu C, Summanen PH, Finegold SM. Murdochiella asaccharolytica gen. nov., sp. nov., a gram-stain-positive, anaerobic coccus isolated from human wound specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **2010**; **60**(Pt 5): 1013-6.
96. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, Kolenbrander PE. Molecular Characterization of Subject-Specific Oral Microflora during Initial Colonization of Enamel. *Appl Environ Microbiol* **2006**; **72**:2837-2848 10.1128/AEM.72.4.2837-2848.2006.
97. Olson JC, Cuff CF, Lukomski S, Lukomska E, Canizales Y, Wu B, Crout RJ, Thomas JG, McNeil DW, Weyant RJ, et al. Use of 16S ribosomal RNA gene analyses to characterize the bacterial signature associated with poor oral health in West Virginia. *BMC Oral Health* **2011**; **11**:7 10.1186/1472-6831-11-7.
98. Mashima I, Kamaguchi A, Nakazawa F. **2011**. The distribution and frequency of oral Veillonella spp. in the tongue biofilm of healthy young adults. *Curr Microbiol* **63**:403–407. doi:10.1007/s00284-011-9993-2.
99. Mashima I, Nakazawa F. **2014**. The influence of oral Veillonella species on biofilms formed by Streptococcus species. *Anaerobe* **28**:54–61. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.05.003.
100. Takahashi N. 2015. Oral microbiome metabolism. *J Dent Res* **94**:1628–1637. doi:10.1177/0022034515606045.
101. Doel JJ, Benjamin N, Hector MP, Rogers M, Allaker RP. **2005**. Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity. *Eur J Oral Sci* **113**:14–19. doi:10.1111/j.1600-0722.2004.00184.x.

102. **Brkić D, Bošnjir J, Bevardi M, Bošković AG, Miloš S, Lasić D, Krivohlavek A, Racz A, Mojsović-Čuić A, Trstenjak NU. 2017.** Nitrate in leafy green vegetables and estimated intake. *Afr J Tradit Complement Altern Med* **14**:31–41. doi:10.21010/ajtcam.v14i3.4.
103. **Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E. 2015.** Dental caries: the disease and its clinical management, 3rd ed Wiley Blackwell, Oxford, United Kingdom.
104. **Yamamoto Y, Washio J, Shimizu K, Igarashi K, Takahashi N. 2017.** Inhibitory effects of nitrite on acid production in dental plaque in children. *Oral Health Prev Dent* **15**:153–156. doi:10.3290/j.ohpd.a37926.
105. **Gilchrist M, Shore AC, Benjamin N. 2011.** Inorganic nitrate and nitrite and control of blood pressure. *Cardiovasc Res* **89**:492–498. doi:10.1093/cvr/cvq309.
106. **Kapil V, Khambata RS, Robertson A, Caulfield MJ, Ahluwalia A. 2015.** Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. *Hypertension* **65**:320–327. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04675.
107. **Montenegro MF, Sundqvist ML, Larsen FJ, Zhuge Z, Carlström M, Weitzberg E, Lundberg JO. 2017.** Blood pressure-lowering effect of orally ingested nitrite is abolished by a proton pump inhibitor. *Hypertension* **69**:23–31. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08081.
108. **Wong, V.K.; Turmezei, T.D.; Weston, V.C.** Actinomycosis. *BMJ* **2011**, 343, d6099.
109. **Gajdács, M.; Urbán, E.; Terhes, G.** Microbiological and Clinical Aspects of Cervicofacial Actinomycetes Infections: An Overview. *Dent. J.* **2019**, 7, 85.
110. **Könönen, E.; Wade, W.G.** Actinomycetes and Related Organisms in Human Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, 28, 419–442.
111. **Ferry, T.; Valour, F.; Karsenty, J.; Breton, P.; Gleizal, A.; Braun, E.; Chidiac, C.; Ader, F.; Sénéchal, A.; Dupieux, C.; et al.** Actinomycosis: Etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infect. Drug Resist.* **2014**, 7, 183–197.
112. **Westermeyer, H.D.; Ward, D.A.; Whittemore, J.C.; Lyons, J.A.** Actinomycetes endogenous endophthalmitis in a cat following multiple dental extractions. *Veter. Ophthalmol.* **2013**, 16, 459–463.
113. **Hall, V.** Actinomycetes—Gathering evidence of human colonization and infection. *Anaerobe* **2008**, 14, 1–7.
114. **Jafari-Ashkavandi, Z.; Kamali, F.** Actinomycetes Colonization in Keratocystic Odontogenic Tumor: A Case Report. *J. Dent.* **2015**, 16, 134–137.
115. **Robati, R.M.; Niknezhad, N.; Bidari-Zerehpoush, F.; Niknezhad, N.** Primary Cutaneous Actinomycosis along with the Surgical Scar on the Hand. *Case Rep. Infect. Dis.* **2016**, 1–3.
116. **Doran, A.; Kneist, S.; Verran, J.** Ecological control: In Vitro inhibition of anaerobic bacteria by oral streptococci. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2004**, 16, 23–27.
117. **D'Amore, F.; Franchini, R.; Moneghini, L.; Lombardi, N.; Lodi, G.; Sardella, A.; Varoni, E.** Actinomycosis of the Tongue: A Case Report and Review of Literature. *Antibiotics* **2020**, 9, 124.
118. **Liu, Y.; Dan, J.; Tao, H.; Xuedong, Z.** Regulation of urease expression of Actinomycetes naeslundii in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Oral Microbiol. Immunol.* **2008**, 23, 315–319.

119. **Wu, C.; Mishra, A.; Yang, J.; Cisar, J.O.; Das, A.; Ton-That, H.** Dual Function of a Tip Fimbrillin of Actinomyces in Fimbrial Assembly and Receptor Binding. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 3197–3206.
120. **Stájer, A.; Barrak, I.; Gajdács, M.; Baráth, Z.; Urbán, E.** Advances in the diagnostics and therapy of cervicofacial actinomycoses: A literature summary. *Fogorv. Szle.* **2020**, accepted.
121. **García-García, A.; Ramírez-Durán, N.; Sandoval-Trujillo, H.; Romero-Figueroa, M.D.S.** Pelvic Actinomycosis. *Can. J. Infect. Dis. Med MİKrobiol.* **2017**, 2017, 1–17.
122. **Pérez-López, F.** Female pelvic actinomycosis and intrauterine contraceptive devices. *Open Access J. Contracept.* **2010**, *1*, 35.
123. **Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki K-I, Parte A (ed).** **2012.** The Actinobacteria. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed, vol 5 Springer-Verlag, New York, NY.
124. **Patrick S, McDowell A.** **2012.** Genus I. *Propionibacterium*, p 1138–1156. In **Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki K-I, Parte A (ed)**, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed Springer-Verlag, New York, NY.
125. **Achermann Y, Goldstein EJC, Coenye T, Shirtliff ME.** **2014.** *Propionibacterium acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. *Clin Microbiol Rev* **27**:419–440. doi:10.1128/CMR.00092-13.
126. **Scholz CFP, Kilian M.** **2016.** The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**:4422–4432. doi:10.1099/ijsem.0.001367.
127. **Aubin GG, Bémer P, Kambarev S, Patel NB, Lemenand O, Caillon J, Lawson PA, Corvec S.** **2016.** *Propionibacterium namnetense* sp. nov., isolated from a human bone infection. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**:3393–3399. doi:10.1099/ijsem.0.001204.
128. **Butler-Wu SM, Sengupta DJ, Kittichotirat W, Matsen FA, Bumgarner RE.** 2011. Genome sequence of a novel species, *Propionibacterium humerusii*. *J Bacteriol* **193**:3678. doi:10.1128/JB.05036-11.
129. **Christensen GJ, Bruggemann H.** Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef Microbes* **2014**; *5*: 201–215.
130. **Dreno B, Martin R, Moyal D, Henley JB, Khammari A, Seite S.** Skin Microbiome and acne vulgaris: Staphylococcus, a new actor in acne. *Exp Dermatol* **2017**; *26*: 798–803.
131. **Rosenthal M, Goldberg D, Aiello A, Larson E, Foxman B.** Skin Microbiota: Microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infect Genet Evol* **2011**; *11*: 839–848.
132. **Szabo K, Erdei L, Bolla BS, Tax G, Biro T, Kemeny L.** Factors shaping the composition of the cutaneous Microbiota. *Br J Dermatol* **2017**; *176*: 344– 351.
133. **Barnard E, Shi B, Kang D, Craft N, Li H.** The balance of metagenomic elements shapes the skin Microbiome in acne and health. *Sci Rep* **2016**; *6*: 39491.
134. **Sanchez DA, Nosanchuk JD, Friedman AJ.** The skin Microbiome: is there a role in the pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis? *J Drugs Dermatol* **2015**; *14*: 127–130.

135. **Saavedra JM. 2007.** Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutr Clin Pract* 22:351–365. doi:10.1177/0115426507022003351.
136. **Lewis ZT, Totten SM, Smilowitz JT, Popovic M, Parker E, Lemay DG, et. al. 2015.** Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome* 3:13. doi:10.1186/s40168-015-0071-z.
137. **Milani C, Turrone F, Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L, Ferrario C, van Sinderen D, Ventura M. 2015.** Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Appl Environ Microbiol* 82:980–991. doi:10.1128/AEM.03500-15.
138. **Arbolea S, Watkins C, Stanton C, Ross RP. 2016.** Gut bifidobacteria populations in human health and aging. *Front Microbiol* 7:1204. doi:10.3389/fmicb.2016.01204.
139. **Serafini F, Strati F, Ruas-Madiedo P, Turrone F, Foroni E, et.al.** Evaluation of adhesion properties and antibacterial activities of the infant gut commensal *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. *Anaerobe* 21:9–17. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.03.003.
140. **Round JL, Mazmanian SK. 2009.** The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9:313–323. doi:10.1038/nri2515.
141. **Nicola S, Amoroso A, Deidda F, Pane M, Allesina S, Mogna L, Del Piano M, Mogna G. 2016.** Searching for the perfect homeostasis: five strains of *Bifidobacterium longum* from centenarians have a similar behavior in the production of cytokines. *J Clin Gastroenterol* 50(Suppl 2):S126–S130.
142. **Pokusaeva K, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2011.** Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes Nutr* 6:285–306. doi:10.1007/s12263-010-0206-6.
143. **El-Soud NH, Said RN, Mosallam DS, Barakat NA, Sabry MA. 2015.** *Bifidobacterium lactis* in treatment of children with acute diarrhea. A randomized double blind controlled trial. *Open Access Maced J Med Sci* 3:403–407. doi:10.3889/oamjms.2015.088.
144. **Singhi SC, Kumar S. 2016.** Probiotics in critically ill children. *F1000Res* 5:407. doi:10.12688/f1000research.7630.1.
145. **Cohen SA, Woodfield MC, Boyle N, Stednick Z, Boeckh M, Pergam SA. 2016.** Incidence and outcomes of bloodstream infections among hematopoietic cell transplant recipients from species commonly reported to be in over-the-counter probiotic formulations. *Transpl Infect Dis* 18:699–705. doi:10.1111/tid.12587.
146. **Weber E, Reynaud Q, Suy F, Gagneux-Brunon A, Carricajo A, Guillot A, Botelho-Nevers E. 2015.** *Bifidobacterium* species bacteremia: risk factors in adults and infants. *Clin Infect Dis* 61:482–484. doi:10.1093/cid/civ347.
147. **Susanna K P Lau , Patrick C Y Woo, Gibson K S Woo,et.al.** *Eggerthella hongkongensis* sp. nov. and *Eggerthella sinensis* sp. nov., two novel *Eggerthella* species, account for half of the cases of *Eggerthella* bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect.* 2004 Aug;Dis. 49:255–263.
148. **Oren A, Garrity GM.** List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67:3140–3143. doi: 10.1099/ijsem.0.002278.
149. **Leffler DA, Lamont JT.** *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med.* 2015;373:287–288.

150. **Simor AE.** Diagnosis, management, and prevention of *Clostridium difficile* infection in long-term care facilities: a review. *J Am Geriatr Soc.* **2010**;58:1556–1564. doi: 10.1111/j.1532-5415.2010.02958.x.
151. **Chitnis AS, Holzbauer SM, Belflower RM, et al.** Epidemiology of community associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011. *JAMA Intern Med.* **2013**;173:1359–1367. doi: 10.1001/jamainternmed.2013.7056.
152. **Hensgens MPM, Keessen EC, Squire MM, et al.** *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clin Microbiol Infect.* **2012**;18:635–645. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x.
153. **Kochan TJ, Somers MJ, Kaiser AM, et al.** Intestinal calcium and bile salts facilitate germination of *Clostridium difficile* spores. *PLoS Pathog.* **2017**;13:e1006443. doi: 10.1371/journal.ppat.1006443.
154. **Baktash A, Terveer EM, Zwitter RD, et al.** Mechanistic insights in the success of fecal Mikrobiota transplants for the treatment of *Clostridium difficile* infections. *Front Microbiol.* **2018**;9:1242. doi: 10.3389/fmicb.2018.01242.
155. **Smits WK, Lyras D, Lacy DB, et al.** *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers.* **2016**;2:16020. doi: 10.1038/nrdp.2016.20.
156. **Androga GO, Hart J, Foster NF, et al.** Infection with toxin A-negative, toxin B-negative, binary toxin-positive *Clostridium difficile* in a young patient with ulcerative colitis. *J Clin Microbiol.* **2015**;53:3702–3704. doi: 10.1128/JCM.01810-15.
157. **Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, et al.** *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *J Clin Invest.* **1995**;95:2004–2011. doi: 10.1172/JCI117885.
158. **Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ,** ESCMID European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* **2014**;20:1–26. doi: 10.1111/1469-0691.12418.
159. **McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al.** Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) *Clin Infect Dis.* **2018**;66:e1–e48. doi: 10.1093/cid/cix1085.
160. **Lucey BP, Hutchins GM, William H. Welch, MD,** and the discovery of *Bacillus welchii*. *Arch Pathol Lab Med.* **2004** Oct;128(10):1193-5.
161. **Navarro MA, McClane BA, Uzal FA.** Mechanisms of Action and Cell Death Associated with *Clostridium perfringens* Toxins. *Toxins (Basel).* **2018** May 22;10(5).
162. **Dewey-Mattia D, Manikonda K, Hall AJ, Wise ME, Crowe SJ.** Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 2009-2015. *MMWR Surveill Summ.* **2018** Jul 27;67(10):1-11.
163. **Takehara M, Takagishi T., Seike S., Ohtani K., Kobayashi K., Miyamoto K., Shimizu T., Nagahama M.** *Clostridium perfringens* α -Toxin Impairs Innate Immunity via Inhibition of Neutrophil Differentiation. *Sci Rep.* **2016** Jun 16;6:28192.
164. **Nagahama M., Ochi S., Oda M., Miyamoto K., Takehara M., Kobayashi K.** Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Toxins (Basel).* **2015** Feb 03;7(2):396-406.
165. **Popoff M.R.** Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS J.* **2011** Dec;278(23):4602-15.

166. **Takehara M., Takagishi T., Seike S., Oda M., Sakaguchi Y., Hisatsune J., Ochi S., Kobayashi K., Nagahama M.** Cellular Entry of *Clostridium perfringens* Iota-Toxin and *Clostridium botulinum* C2 Toxin. *Toxins* (Basel). **2017** Aug 11;9(8).
167. **Keyburn A.L., Boyce J.D., Vaz P., Bannam T.L., Ford M.E., Parker D., Di Rubbo A., Rood J.I., Moore R.J.** NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* **2008** Feb 08;4(2):e26.
168. **Kiu R, Hall LJ.** An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerg Microbes Infect.* **2018** Aug 06;7(1):141.
169. **Buboltz J.B., Murphy-Lavoie H.M.** StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): Aug 15, **2020**. Gas Gangrene.
170. **Basta M., Annamaraaju P.** StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): Apr 10, **2020**. Bacterial Spores.
171. **Van Bunderen C.C., Bomers M.K., Wesdorp E., Peerbooms P., Veenstra J.** *Clostridium perfringens* septicemia with massive intravascular haemolysis: a case report and review of the literature. *Neth J Med.* **2010** Sep;68(9):343-6.
172. **Peck MW (2009)** Biology and genomics analysis of *Clostridium botulinum*. In: Poole RK, editor. *Advances in Microbial Physiology*: Academic Press. pp. 183– 265, 320.
173. **Carter AT, Paul CJ, Mason DR, Twine SM, Alston MJ, et al. (2009)** Independent evolution of neurotoxin and flagellar genetic loci in proteolytic *Clostridium botulinum*. *BMC Genomics* 10: 115.
174. **Barash JR, Arnon SS (2014)** A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J Infect Dis* 209: 183–191.
175. **Bruggemann H, Wollherr A, Mazuet C, Popoff M (2011)** *Clostridium botulinum*. In: Fratamico P, Liu Y, Kathariou S, editors. *Genomes of Foodborne and Waterborne Pathogens*: ASM Press. pp. 185–212.
176. **Lindström M, Fredriksson-Ahomaa M, and Korkeala H (2009)** Molecular epidemiology of group I and group II *Clostridium botulinum*. In: **Bruggemann H, Gottschalk, G.**, editor. *Clostridia, molecular biology in the post-genomic era*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom. pp. 103–130.
177. **Hackett R, Kam PC (2007)** Botulinum toxin: pharmacology and clinical developments: a literature review. *Med Chem* 3: 333–345.
178. **Johnson EA (2007)** Food Microbiology: fundamentals and frontiers. In: **Doyle MP, Beuchat, L. R.**, editor. *Clostridium botulinum*. 3rd ed. Food Microbiology: fundamentals and frontiers: ASM Press. pp. 401–421.
179. **Raphael BH, Luquez C, McCroskey LM, Joseph LA, Jacobson MJ, et al. (2008)** Genetic homogeneity of *Clostridium botulinum* type A1 strains with unique toxin gene clusters. *Appl Environ Microbiol* 74: 4390–4397.
180. **Fang PK, Raphael BH, Maslanka SE, Cai S, Singh BR (2010)** Analysis of genomic differences among *Clostridium botulinum* type A1 strains. *BMC Genomics* 11: 725.
181. **Raphael BH, Joseph LA, McCroskey LM, Luquez C, Maslanka SE (2010)** Detection and differentiation of *Clostridium botulinum* type A strains using a focused DNA Microarray. *Mol Cell Probe* 24: 146–153.

182. **Setlow P (2014)** Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know. *J Bacteriol* 196: 1297–1305.
183. **Stringer SC, Webb MD, Peck MW (2009)** Contrasting effects of heat treatment and incubation temperature on germination and outgrowth of individual spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* bacteria. *Appl Environ Microbiol* 75: 2712–2719.
184. **Stringer SC, Webb MD, Peck MW (2011)** Lag time variability in individual spores of *Clostridium botulinum*. *Food Microbiol* 28: 228–235.
185. **Webb MD, Stringer SC, Le Marc Y, Baranyi J, Peck MW (2012)** Does proximity to neighbours affect germination of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*? *Food Microbiol* 32: 104–109.
186. **Bae C, Bourget D.** StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): May 12, 2021. Tetanus.
187. **Tadele H.** Clinical Profile and Outcome of Pediatrics Tetanus: The Experience of a Tertiary Hospital in Ethiopia. *Ethiop J Health Sci.* 2017 Sep;27(5):559-564.
188. **Finkelstein P, Teisch L, Allen CJ, Ruiz G.** Tetanus: A Potential Public Health Threat in Times of Disaster. *Prehosp Disaster Med.* 2017 Jun;32(3):339-342.
189. **Hassel, B.** Tetanus: pathophysiology, treatment, and the possibility of using botulinum toxin against tetanus-induced rigidity and spasms. *Toxins (Basel).* 5, 73–83. (2013).
190. **Schmieg, N., Berscenyi, K. & Schiavo, G.** in *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins* (eds J. Alouf, D. Ladant, & M. R. Popoff) Ch. 12, 337–360 (Elsevier, 2015).
191. **Surana, S. et al.** The travel diaries of tetanus and botulinum neurotoxins. *Toxicon* 147, 58–67 (2018).
192. **Alshantiti FM, Al-Masaudi SB, Al-Hejin AM, Redwan EM.** Adjuvants for *Clostridium tetani* and *Clostridium diphtheriae* vaccines updating. *Hum Antibodies.* 2017;25(1-2):23-29.
193. **Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM.** The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal Microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 2014;38:996e1047.
194. **Hentges DJ.** Anaerobes as normal flora. In: Finegold SM, George WL, editors. *Anaerobic infections in humans.* , San Diego: Elsevier; 2012. p. 37e53.
195. Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and procedures for detection of anaerobes in clinical specimens. Document M56-A. CLSI, Approved Guideline. Wayne, PA: CLSI; 2014.
196. **Justesen US, Skov MN, Knudsen E, Holt HM, Sogaard P, Justesen T.** 16S rRNA gene sequencing in routine identification of anaerobic bacteria isolated from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2010;48:946e8.
197. **Brook I.** Spectrum and treatment of anaerobic infections. *J Infect Chemother* 2016;22:1e13.
198. **Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson Jr RB, et al.** A guide to utilization of the Microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). *Clin Infect Dis* 2013;57. e22e21.

199. **Carroll K. C., Pfaller M.A., Landry M.L., McAdam A.J., Patel R., Richter S.S., Warnock D.W.** Manual of Clinical Microbiology (ASM Books) 12th Edition Washington, DC : ASM Press, **2019**
200. **Harrington SM.** If specimen collection and processing guidelines fall, does anyone hear them? Pre-analytical conundrums in clinical microbiology. *CMN* **2014**;36:105e14.
201. **Peeters B, Magerman K, Waumans L, Cartuyvels R.** Laboratory survey and literature review of anaerobic bacteriology: foundations of a clinically orientated and evidence-based workup for anaerobic cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2016**;86:15e22.
202. **Crobach MJT, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, et al.** European Society of Clinical Mikrobiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Mikrobiol Infect* **2016**;22:S63e81.
203. **Valour F, Sen echal A, Dupieux C, Karsenty J, Lustig S, Breton P, et al.** Actino- mycosis: etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infect Drug Resist* **2014**;7:183e97.
204. **Justesen T, Justesen US.** A simple and sensitive quality control method of the anaerobic atmosphere for identification and antiMikrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2013**;76:138e40.
205. **Egwari L.O., Buraimoh M.O., Nwokoye N.N.** Evaluation of two anaerobic systems for isolation of anaerobes. **2011**. Licensee PAGEPress, Italy
206. **Arellano M, Jomard P, El Kaddouri S, Roques C, Nepveu F, Couderc F.** Routine analysis of short-chain fatty acids for anaerobic bacteria identification using capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **2000**;741(1):89–100.
207. **Veloo ACM, Welling GW, Degener JE.** The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. *Anaerobe.* **2011**;17(4):211–2.
208. **Lin YT, Vaneechoutte M, Huang AH, Teng LJ, Chen HM, Su SL, et al.** Identification of Clinically Important Anaerobic Bacteria by an Oligonucleotide Array. *J Clin Microbiol.* **2010**;48(4):1283–90.
209. **Jensen A, Fago-Olsen H, Sorensen CH, Kilian M.** Molecular mapping to species level of the tonsillar crypt microbiota associated with health and recurrent tonsillitis. *PLoS One* **2013**;8:e56418.
210. **Boyanova L, Kolarov R, Mitov I.** Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. *Anaerobe* **2015**;31:4e10.
211. **Claros M, Citron DM, Goldstein EJ, Merriam CV, Tyrrell KL.** Differences in distribution and antimicrobial susceptibility of anaerobes isolated from complicated intra-abdominal infections versus diabetic foot infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2013**;76:546e8.
212. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Methods for antiMikrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Document M11eA8. Approved Standard. Wayne, PA: CLSI; **2019**.
213. **Nwaokorie FO, Ogunsola FT, Coker AO.** Beta-lactamase production in anaerobic bacteria. *Rev Infect* **2010**;1:172-9.
214. **Engelkrik, P. G., Engelkrik, J. D.,** Anaerobes of Clinical Importance, Textbook of Diagnostic Mikrobiology, 3rd ed., St. Louis: Saunders Elsevier, **2007**, p:587-664.

215. **Procop, G. W., Church, D.L., Hall, G.S., Janda, W. M., et al.**, The Anaerobic Bacteria. seventh edition ed. Koneman's Color Atlas and Text Book of Diagnostic Mikrobiology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2017**.
216. **Shah, N.B.; Tande, A.J.; Patel, R.; Berbari, E.F.** Anaerobic prosthetic joint infection. *Anaerobe* **2015**, *36*, 1–8.
217. **Ananth-Shenoy, P.; Vishwanath, S.; Targain, R.; Shetty, S.; Sunil-Rodrigues, G.; Mukhopadhyay, C.; Kiran, C.** Anaerobic infections in surgical wards: A two year study. *Iran. J. Microbiol.* **2016**, *8*, 181–186.
218. **Citron, D.M.; Goldstein, E.J.C.; Merriam, C.V.; Lipsky, B.A.; Abramson, M.A.** Bacteriology of Moderate-to-Severe Diabetic Foot Infections and In Vitro Activity of Antimicrobial Agents. *J. Clin. Mikrobiol.* **2007**, *45*, 2819–2828.
219. **Byun, J.H.; Kim, M.; Lee, Y.; Lee, K.; Chong, Y.** Antimicrobial Susceptibility Patterns of Anaerobic Bacterial Clinical Isolates From 2014 to 2016, Including Recently Named or Renamed Species. *Ann. Lab. Med.* **2019**, *39*, 190–199.
220. **Demir C, Kesli R.** Identification of Anaerobic Gram-Negative Bacilli Isolated from Various Clinical Specimens and Determination of Antibiotic Resistance Profiles with E-Test Methods. *Mikrobiyol Bul* **2018**;52(1):72-9)
221. **Özcan N, Saat N, Atmaca N.** Klinik örneklerden soyutlanan anaerob bakterilerin in vitro antibiyotik duyarlılıkları. *FLORA* 2020;25(2):245-55.
222. **Doğan M, Baysal B.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen anaerob bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2010;44:211-9.
223. **Uysal B. E., Çelik C, Alan Ç, Kaya H, Gözel MG, Bakıcı MZ.** Klinik örneklerden izole edilen anaerobik bakteriler: yedi yıllık değerlendirme. *Cumhuriyet Tıp Derg* **2014**;36:327-31.
224. **Kiremitçi A, Türkkan A, Akgün Y, et al.** Isolation and Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria Isolated from Clinical Samples. *ANKEM*. 2008;22(3):132–144.)
225. **Bacalan F, ÇakırF, Özcan N, et al.** Identification and antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria isolated from clinical samples. *J Bacteriol Mycol Open Access*. 2020;8(1):29–32. DOI: 10.15406/jbmoa.2020.08.00269
226. **Boyanova L, Kolarov R, Gergova G, et al.** Anaerobic bacteria in 118 patients with deep-space head and neck infections from the University Hospital of Maxillofacial Surgery, Sofia, Bulgaria. *J Med Microbiol.* **2006**;55(9):1285–1289.
227. **Wybo, I., Van den Bossche D., Soetens O, et al.**, Fourth Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2014. 69(1): p. 155-161.
228. **Ercis S, Tunçkanat F, Haşcelik G.** Anaerobic Bacteria Isolated From Patients With Suspected Anaerobic Infections. *Mikrobiol Bul.* 2005;39:447–454.
229. **Cobo F., Guillot V. and Navarro-Mari J.M.** Breast Abscesses Caused by Anaerobic Microorganisms: Clinical and Microbiological Characteristics. *Antibiotics (Basel)*. **2020** Jun; 9(6): 341.)
230. **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;47:64–9.

231. **Jung-Hyun Byun M.D., Myungsook Kim, Ph.D., Yangsoon Lee , M.D., Kyungwon Lee, M.D., and Yunsop Chong, Ph.D.** Antimicrobial Susceptibility Patterns of Anaerobic Bacterial Clinical Isolates From 2014 to 2016, Including Recently Named or Renamed Species *Ann Lab Med* 2019;39:190-199.
232. **Badr M.T., Blümel B., Baumgartner S., Johanna M. A. Komp and Häcker G.** AntiMİKrobial Susceptibility Patterns and Wild-Type MİK Distributions of Anaerobic Bacteria at a German University Hospital: A Five-Year Retrospective Study (2015–2019). *Antibiotics* 2020, 9, 823; doi:10.3390/antibiotics 9110823.
233. **Ishak N, Abdul W. Z, Amin N. S, Ibrahim R.** Susceptibility patterns of anaerobes isolated from clinical specimens in tertiary Hospital, Malaysia *Malays J Pathol* **2020**; 42(2): 245 – 252
234. **Naidoo S, Perovic O, Richards GA, Duse AG.** Clinically significant anaerobic bacteria isolated from patients in a South African academic hospital: Antimicrobial susceptibility testing, *S Afr Med J* 2011; 101: 732-4.
235. **Bozkurt H, Güdücüoğlu H, Bayram Y, Gülmez S, Kutulay N, Bozkurt N, et al.** Klinik örneklerden izole edilen anaerob bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. *Van Tıp Derg* 2004;11:85-91.
236. **Katsandri A, Avlamis A, Pantazatou A, et al.** In vitro activities of tigecycline against recently isolated Gramnegative anaerobic bacteria in Greece, including metronidazole-resistant strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55(3): 231-6.
237. **Akhi MT, Ghotaslou R, Beheshtirouy S, et al.** Antibiotic susceptibility pattern of aerobic and anaerobic bacteria isolated from surgical site infection of hospitalized patients. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 27:e20309.
238. **Lee Y, Park Y, Kim M.S., Yong D, Jeong S.H, Lee K, and Chong Y.** Antimicrobial Susceptibility Patterns for Recent Clinical Isolates of Anaerobic Bacteria in South Korea *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Sep; 54(9): 3993–3997.