

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

**ANAEROBİK BAKTERİLERİN TANIMLANMASINDA
MATRİKS ARACILI LAZER DEZORPSİYON İYONİZASYON
UÇUŞ ZAMANI KÜTLE SPEKTROMETRİSİNİN (MALDI-TOF
MS) DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Arş. Gör. Dr. Mehmet ÖLMEZ

EKİM-2020

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

**ANAEROBİK BAKTERİLERİN TANIMLANMASINDA
MATRİKS ARACILI LAZER DEZORPSİYON İYONİZASYON
UÇUŞ ZAMANI KÜTLE SPEKTROMETRİSİNİN (MALDI-TOF
MS) DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Arş. Gör. Dr. Mehmet ÖLMEZ

**DANIŞMAN:
Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŞ**

Ekim-2020



Esra ve Asya'ya

BEYAN

Bu çalışma, T.C. Sakarya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan 26/02/2019 tarihinde onay olarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih:

01/10/2020

Arş. Gör. Dr. Mehmet ÖLMEZ

İmza

TEŞEKKÜR

Gerek tıpta uzmanlık sınavı sürecinde gerekse de tıpta uzmanlık eğitimi sürecinde bana karşı gösterdiği sonsuz sabrı ve desteğiyle hakkını ödeyemeyeceğim sevgili eşim Esra ALICIOĞLUGİL ÖLMEZ'e, çocukluk dönemimden beri eğitim hayatım boyunca bana olan inançları ve destekleri hiç bitmeyen başta annem Şerife ÖLMEZ ve babam Mehmet ÖLMEZ olmak üzere tüm aileme,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, fikir ve tecrübelerinden faydalandığım tez danışman hocam Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ'e, uzmanlık eğitim süreci boyunca bilgi, fikir ve tecrübelerini sunan değerli hocam Prof. Dr. Mehmet KÖROĞLU'na,

Laboratuvar çalışmalarını süresince yardımlarıyla bana destek olan, uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan uzman hekimlerimiz Hüseyin Agah TERZİ, Tayfur DEMİRAY, Özlem AYDEMİR, Engin KARAKEÇE ve Hande TOPTAN'a, asistan arkadaşlarım Hüseyin HATİPOĞLU, Kerem YILMAZ, Ümit KILIÇ, Tuęba AYHANCI, Elif ÖZÖZEN ŐAHİN, Merve İlhan AKSU, Gökçen AYDOĞDU'ya ve tüm laboratuvar teknisyenlerimize teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

Arş. Gör. Dr. Mehmet ÖLMEZ

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMA VE SİMGELER.....	vi
ŞEKİLLER.....	viii
TABLolar	ix
RESİMLER.....	xi
EKLER.....	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. ANAEROP BAKTERİLERİN TARİHÇESİ.....	4
2.2. BAKTERİLERİN OKSİJEN İLE İLİŞKİLERİNE GÖRE SINIFLANDIRILMASI.....	5
2.3. ANAEROP BAKTERİLERİN SINIFLANDIRILMASI.....	8
2.4. NORMAL İNSAN MİKROBİYOTASINDA BULUNAN ANAEROP BAKTERİLER.....	10
2.5. ANAEROP BAKTERİLERİN PATOGENEZ MEKANİZMALARI.....	11
2.6. ANAEROP BAKTERİ ENFEKSİYONLARI	12
2.7. ANAEROP ENFEKSİYONLARDA ÖRNEK ALINMASI VE LABORATUVARA TAŞINMASI.....	14
2.7.1. Örnek Alınması	14
2.7.2. Örneklerin Laboratuvara Taşınması.....	16

2.8. LABORATUVARDA ÖRNEKLERİN İŞLENMESİ	16
2.8.1. Direkt İnceleme	16
2.8.2. Anaerop Bakterilerin Kültürünün Yapılması	18
2.8.2.1. Genel Üretim Besiyerleri	20
2.8.2.2. Seçici Besiyerleri	20
2.8.2.3. Klinik Örneklerin Besiyerlerine Ekimi ve İnkübasyon.....	21
2.8.3. İnkübasyon Sonrası Kültürlerin İncelenmesi	23
2.8.4. Anaerop Bakterilerin Tanımlanması (İdentifikasyon)	27
2.8.4.1. Konvansiyonel Yöntemler	27
2.8.4.2. Hızlı Enzimatik İdentifikasyon Sistemleri	31
2.8.4.3. Moleküler Yöntemler	31
2.8.4.4. MALDI-TOF MS	32
2.9. ANAEROP ENFEKSİYONLARIN TEDAVİSİ	34
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
3.1. ETİK KURUL ONAYI.....	36
3.2. SUŞLARIN SEÇİMİ.....	36
3.3. KULLANILAN BESİYERLERİ, KİTLER VE CİHAZLAR	37
3.3.1. Anaerobik Agar ve Schaedler Agar	37
3.3.2. <i>Bacteroides</i> Safra Eskülin Agar (BSE)	38
3.3.3. Brusella Agar	38
3.3.4. Skim Milk Besiyeri	39
3.3.5. Otomatize Sistem Tanı Kiti.....	39
3.3.6. MALDI-TOF MS	40
3.3.7. Biyokimyasal Testler	40
3.3.8. Anaerop Poşetler ve İndikatörler	40

3.4. BAKTERİ SÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI.....	41
3.5. YÖNTEM.....	42
3.5.1. Örneklerin Toplanması ve İşleme Alınması	42
3.5.2. Kültür İşlemleri ve İdentifikasyon	42
3.5.3. Kan Kültürü Şişesinden Direkt İdentifikasyon	44
4. BULGULAR.....	46
4.1. KONVANSİYONEL YÖNTEM BULGULARI	51
4.2. OTOMATİZE SİSTEM BULGULARI	54
4.3. MALDI-TOF MS İLE KAN KÜLTÜRÜ ŞİŞESİNDEN DİREKT İDENTİFİKASYON BULGULARI	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	65
KAYNAKLAR	73
EKLER.....	85
ÖZGEÇMİŞ	86

KISALTMA VE SİMGELER

ADT	Antibiyotik duyarlılık testi
ATCC	American Type of Culture Collection
BOS	Beyin-omurilik sıvısı
BMD	Broth mikrodilüsyon
BSE	<i>Bacteroides</i> safra eskülin agar
°C	Santigrat derece
CCFA	Sikloserin sefoksitin fruktoz agar
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	Koloni oluşturan birim (colony forming unit)
CHCA	α -cyano-4-hidroksisinnamik asit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO ₂	Karbondioksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
Eh	Oksidasyon-redüksiyon (redoks) potansiyeli
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EYA	Yumurta sarılı agar
FDA	Food and Drug Administration
g	Gram
GPAK	Gram pozitif anaerop koklar
H ₂	Hidrojen
H ₂ S	Hidrojen sülfür
KVLB	Kanamisin-vankomisin hemolize kanlı agar
MALDI-TOF MS	Matrix-aracılı lazer dezorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi
µg	Mikrogram
µg/ml	Mikrogram/mililitre
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyonu

ml	Mililitre
M.Ö.	Milattan önce
M.S.	Milattan sonra
N ₂	Azot
O ₂	Oksijen
PCR	Polimerize zincir reaksiyonu
PEA	Feniletıl alkol agar
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SF	Serum fizyolojik
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SPS	Sodyum polianetol sülfonat
SÜEAH	Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi
UV	Ultraviole
xG	Gravite (santrifüj hızı)

ŞEKİLLER

Şekil 1. Farklı oksijen yoğunluklarında bakterilerin üreme özellikleri

Şekil 2. MALDI-TOF MS'in çalışma prensibi

Şekil 3. Anaerob bakterilerin konvansiyonel yöntemler, Vitek 2 sistemi, MALDI-TOF MS yöntemi ile hem koloniden hem de direkt kan kültür şişesinden yapılan identifikasyonunun karşılaştırılması

Şekil 4. *Bacteroides fragilis*'in MALDI-TOF MS ile elde edilen kütle spektrumu

Şekil 5. *Prevotella bivia*'nın MALDI-TOF MS ile elde edilen kütle spektrumu

Şekil 6. *Finegoldia magna*'nın MALDI-TOF MS ile elde edilen kütle spektrumu

Şekil 7. *Peptostreptococcus anaerobius*'un MALDI-TOF MS ile elde edilen kütle spektrumu

TABLÖLAR

Tablo 1. Klinik örneklere sıkça karşılaşılan anaerop bakterilerin morfolojilerine göre sınıflandırılması

Tablo 2. İnsan mikrobiyotasında bulunan anaerop bakteriler (cins düzeyinde)

Tablo 3. Anaerop enfeksiyon şüphesinde alınması gereken uygun örnekler

Tablo 4. Anaerop bakterilerin primer izolasyonunda kullanılan temel besiyerleri

Tablo 5. Ultraviyole ışık altında floresans veren anaerop bakteriler

Tablo 6. Bazı anaerop bakterilerin karakteristik koloni özellikleri

Tablo 7. Anaerop bakterilerin identifikasyon diskleri ile ön tanısı

Tablo 8. Bazı gram pozitif basillerin identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler

Tablo 9. Bazı gram negatif basillerin identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler

Tablo 10. Anaerop kültür işlemine alınan örnek türleri ve üreyen bakteri sayıları

Tablo 11. Üreyen anaerop gram negatif bakterilerin örnek türüne göre dağılımı

Tablo 12. Üreyen anaerop gram pozitif bakterilerin örnek türüne göre dağılımı

Tablo 13. Anaerop bakteri izole edilen örneklere üreyen aerop/fakültatif anaerop bakterilerin dağılımı

Tablo 14. Örneklerden izole edilen aerop/fakültatif anaerop bakterilerin dağılımı

Tablo 15. Anaerop bakterilerin identifikasyonunda MALDI-TOF MS ve Konvansiyonel + Vitek 2 yöntemlerinin kombine sonuçları ile karşılaştırılması

Tablo 16. Anaerop bakterilerin MALDI-TOF MS ile koloniden ve direkt kan kültür şişesinden identifikasyonunun karşılaştırılması

Tablo 17. Anaerop bakterilerin konvansiyonel yöntemler, Vitek 2 sistemi, MALDI-TOF MS yöntemi ile hem koloniden hem de direkt kan kültür şişesinden yapılan identifikasyonunun karşılaştırılması



RESİMLER

Resim 1. Anaerop bakterilerin gram boyama görüntüleri (bu tez çalışmasından)

Resim 2. Çeşitli anaerop bakterilerin koloni morfolojileri (bu tez çalışmasından)

Resim 3. Bu tez çalışmasında kullanılan Vitek 2 cihazı

Resim 4. Bu tez çalışmasında kullanılan MALDI-TOF MS cihazı

Resim 5. Bu tez çalışmasında kullanılan anaerop poşet ve indikatör

Resim 6. Gram negatif basillerin identifikasyon diskleriyle tanımlanması

Resim 7. Kan kültürü şişesinden MALDI-TOF MS ile direkt identifikasyon prosedürü

EKLER

Ek 1. Sakarya Üniversitesi Etik Kurulu Onayı



ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Bu çalışmada MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak hem koloniden hem de kan kültürü şişesinden direkt anaerop bakterilerin identifikasyonunun konvansiyonel ve otomatize ticari yöntemlerle karşılaştırılarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmada 67 klinik izolat ve 2 standart suş incelenmiştir. Konvansiyonel yöntemler, Vitek 2 identifikasyon sistemi, üremiş kolonilerden ve direkt olarak kan kültür şişelerinden MALDI-TOF MS ile tanımlanmaları test edilmiştir. MALDI-TOF MS yöntemiyle direkt olarak kan kültürü şişelerinden tarafımızdan optimize edilen yöntemle bakteriler tanımlanmıştır. Bu yöntemde birkaç santrifüj ve ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen süpernatant kısımdan alınan örnek MALDI-TOF MS cihazında okutulmuştur.

BULGULAR: Toplam 69 anaerop bakteriden konvansiyonel yöntemlerle 6'sı (%8,7) tür düzeyinde, 49'u (%71) cins düzeyinde; Vitek 2 sistemiyle 36'sı (%52,1) tür düzeyinde, 54'ü (%78,2) ise cins düzeyinde; MALDI-TOF MS kullanılarak koloniden yapılan işlemle bakterilerin tamamı (%100) tür düzeyinde; MALDI-TOF MS kullanılarak direkt kan kültürü şişesinden 43'ü (%62,3) tür düzeyinde, 47'si (%68,1) cins düzeyinde doğru olarak tanımlanmışlardır.

SONUÇ: Bu çalışmada MALDI-TOF MS yönteminin anaerop bakterilerin gerek koloniden gerekse de kan kültür şişesinden direkt olarak identifikasyonunda büyük başarıyla kullanılabileceği ve sonuç verme süresini oldukça kısalttığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, daha yüksek oranda gram negatif anaerop bakterilerde olmak üzere, konvansiyonel ve otomatize ticari yöntemlerle büyük ölçüde uyumludur. Ancak yöntem henüz tüm laboratuvarlarda kullanılabilecek şekilde standardize edilememiştir. Bu konuda daha detaylı ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: anaerop, identifikasyon, izolasyon, kan kültürü, MALDI-TOF MS

SUMMARY

Evaluation of Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for Identification of Anaerobe Bacteria

INTRODUCTION AND AIM: The aim of this study to investigate the identification of anaerobic bacteria from colonies and directly blood culture bottles by using MALDI-TOF MS method by comparing with conventional and automated commercial methods.

MATERIAL AND METHOD: 67 clinical isolates and 2 standard strains were examined in the study. Identification by conventional methods, Vitek 2 identification system, from grown colonies and directly blood culture bottles by MALDI-TOF MS was tested. With the MALDI-TOF MS method, bacteria were identified directly from the blood culture bottles with the method optimized by us. In this method, the sample taken from the supernatant part obtained after a few centrifugation and extraction processes was read in MALDI-TOF MS device.

RESULTS: From a total of 69 anaerobic bacteria; with conventional methods, 6 (%8,7) of them at the species level and 49 (%71) of them at the genus level; with the Vitek 2 system, 36 (%52,1) of them at the species level and 54 (78.2%) of them at the genus level; with MALDI-TOF MS from the bacterial colonies, all of them (%100) at the species level; with MALDI-TOF MS from the direct blood culture bottles, 43 (%62,3) of them at the species level and 47 (68.1%) of them at the genus level were correctly identified.

CONCLUSION: In this study, it was determined that MALDI-TOF MS method can be used with great success for identifying anaerobic bacteria from both colonies and directly blood culture bottles and significantly shorten the result time. The results obtained are broadly consistent with conventional and automated commercial methods, with a higher proportion of gram-negative anaerobic bacteria. However, the method has not yet been standardized to be used in all laboratories. More detailed and comprehensive studies are needed on this subject.

Keywords: anaerobe, blood culture, identification, isolation, MALDI-TOF MS

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Anaerop bakteriler ağız boşluğu, kalın barsak ve kadın genital sistemi gibi anatomik bölgelerin normal mikrobiyotasının önemli bir kısmını oluşturur. Bununla birlikte hayatı tehdit edici enfeksiyonlara da yol açabilmektedir. Bu nedenle anaerop bakterilerin yol açtığı enfeksiyonların tanısı büyük önem taşımaktadır. Diğer enfeksiyonlarda olduğu gibi anaerop enfeksiyonlarda da kesin tanı için mikrobiyolojik çalışmaların yapılması esastır. Ancak, anaerop bakterilerin rutin laboratuvarlarda sıkça karşılaşılan aerop ya da fakültatif anaerop bakterilere göre klinik örneklerden izole edilmeleri ve tanımlanmaları daha zor ve zaman alıcıdır. Ayrıca özel donanım ve deneyim gerektirmektedir. Bundan dolayı klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının büyük bir kısmında anaerop bakterilere yönelik çalışmalar yapılamamaktadır. Bu da klinisyenleri anaerop enfeksiyon şüphesi olduğunda ampirik tedaviye yönlendirmektedir. Bununla birlikte son yıllarda dünya genelinde yapılan çalışmalarda anaerobik enfeksiyonlara yol açan bakterilerde antibiyotik direncinin arttığı gözlenmektedir. Bu nedenle mikrobiyoloji laboratuvarlarında anaerop bakterilere yönelik çalışmaların yapılması önem kazanmakta, hatta bu çalışmaların rutin kültürün bir parçası olması gerekmektedir (Olsen et al. 1999, Finegold 2000, Willke ve ark. 2008, Norin 2011).

Anaerop enfeksiyonların tanımlanması çok eski yıllarda başlamıştır. M.Ö. 17. yüzyılda antik Mısır el yazmalarında ve M.Ö. 5. yüzyılda Hipokrat'ın yazılarında tetanozun klinik özelliklerinden bahsedilmiştir. Bununla birlikte 1862 yılında Louis Pasteur atmosferik oksijen yokluğunda bir bakterinin butirik asiti fermente ettiğini bularak anaerop bakterileri ilk keşfeden bilim insanı olarak tarihe geçmiştir. 19. yüzyılın sonlarında Veillon ve Zuber kötü kokulu akıntıya neden olan bazı enfeksiyonlarda anaerop bakterilerin rolünü göstermiştir. 20. yüzyılın başlarında

anaerop fusiform bakteriler tanımlanmış ve bunlarla ilgili çok sayıda makale yayımlanmıştır. Schottnueller'in puerperal sepsis etkeni olarak anaerop streptokokları göstermesi ve David Smith'in 1920'li yıllarda aspirasyon pnömonisini tanımlaması da anaerop enfeksiyonlarda patogenezi çalışmalarının ilk örnekleri olarak kabul edilmektedir. (Gürler 2011, Bartlett 2015).

Anaerop bakteriler insan vücudunda başta gastrointestinal sistem olmak üzere birçok bölgede normal mikrobiyota üyesi olarak yer almaktadır. Kolon ve ağız boşluğundaki bakterilerin %90'dan fazlası anaeroplardır. Endojen mikrobiyotadaki anaerop bakterilerin eksojen patojenlere karşı kolonizasyon direnci oluşturmaları gibi birçok faydası vardır. Ancak bu bakterilerin fırsatçı patojen olduklarını ve immün supresyon gibi bazı faktörlerin etkisiyle özellikle cerrahi girişimler veya travma sonrasında kolonize oldukları bölgelerden köken alarak deri ve yumuşak doku, intraabdominal, plöropulmoner, kadın genital sistemi gibi endojen polimikrobiyal enfeksiyonlara yol açarak hayatı tehdit edebileceklerini akılda tutmak gerekir. Eksojen anaerobik enfeksiyonlara ise ağırlıklı olarak *Clostridioides difficile* hariç Gram pozitif spor oluşturan basiller neden olmaktadır (Belizário et al. 2015, Cohen-Poradosu et al. 2015).

Oksijenle ilişkileri nedeniyle anaerop bakterilerin klinik örneklerden izolasyonu zor, zaman alıcı ve emek yoğun işlemler gerektirmektedir. Bunu başarmak için örneklerin uygun şartlarda toplanması, laboratuvara taşınması ve vakit kaybetmeden kültür işlemine alınarak bakterilerin oksijenle temasının minimumda tutulması gerekir. Anaerop bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle identifikasyonunda; iş yükünün fazla olması, uzun zaman alması ve anaerobik ortamı sağlamada güçlük çekilmesi gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu olumsuzluklar düşünüldüğünde daha hızlı, iş yükü az olan yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni bir yöntem olan MALDI-TOF MS ile bakteri identifikasyonu tüm işlemler dahil olmak üzere 5-10 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemle anaerop bakterilerin identifikasyonu da sağlanmaktadır (Clark et al. 2013).

Kan dolaşımı enfeksiyonları, hızla tedavi edilmesi gereken ölümcül bir tablodur. Tüm bakteriyemilerin %1-17'si anaerop bakteriler tarafından meydana gelmektedir

(Brook 2010). Uygun şekilde tedavi edilmeyen hastalarda mortalite oranı her geçen saatte %7,6 artmaktadır (Kumar et al 2006). Bu nedenle hastalardan kan kültürü alınıp etken mikroorganizmanın tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testinin yapılması hayati önem taşımaktadır. Ancak kültür işlemleri uzun zaman aldığından hastalara ampirik olarak geniş spektrumlu antibiyotikler başlanmaktadır. Bu da hem mikroorganizmaların antibiyotik direncini artırmakta hem de uygunsuz tedavilerin uygulanmasına yol açmaktadır (Faron et al. 2017). Anaerop bakterilerin kültürde üretilip tanımlanması uzun zaman aldığından, tanı süresini kısaltmak amacıyla mikroorganizmaların izolasyon işlemi henüz yapılmadan MALDİ-TOF MS ile direkt olarak kan kültürü şişesinden identifikasyonu araştırmacıların ilgisini çeken yeni bir konudur. Bu yöntemle etken bakterilerin tanımlanması daha kısa sürmekte ve hastalara uygun tedavi daha erken başlanabilmektedir. Ancak henüz sınırlı sayıda bakteri bu yöntemle tanımlanabilmiştir (Almuhayawi et al. 2015).

Anaerop bakterilerin kültürlerinin zahmetli olması, uzun sürmesi ve genelde enfeksiyonların polimikrobiyal olması nedeniyle anaerobik antibiyotik duyarlılık testleri (ADT) dünya genelinde rutin olarak çok az sayıda merkezde yapılmaktadır. Bundan dolayı anaerobik enfeksiyonların tedavisi çoğunlukla ampirik olarak gerçekleştirilmektedir (Cobo et al. 2020). Anaerop bakterilerin antibiyotik direnç oranlarında son yıllarda artış görülse de direnç oranları aeroplara kıyasla daha düşüktür. Ancak intraabdominal enfeksiyonlardan izole edilen başlıca anaerop bakteri olan *Bacteroides* türlerinin karbapenemler ve metronidazol gibi güçlü antibiyotiklere karşı bile dirençli olabileceği bildirilmiştir (Hecht 2004, Wybo et al. 2014). Tedavide anaerop bakterilerin de antibiyotiklere karşı dirençli olabilecekleri göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu çalışmada, Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi (SÜEAH) Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen klinik örneklerden izole edilen anaerop bakterilerin identifikasyonu MALDI-TOF MS ile yapılarak konvansiyonel ve otomatize ticari yöntemlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır. İkincil amaç olarak; daha hızlı identifikasyon yapabilmek için, kan kültür şişesinden pozitif sinyal alındıktan sonra anaerop bakterilerin direkt olarak MALDI-TOF MS ile identifikasyonu da araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ANAEROP BAKTERİLERİN TARİHÇESİ

Anaerop enfeksiyonlarla ilgili en eski yazılı belge olarak tetanoz hastalığının kliniğinden bahseden M.Ö. 17. yüzyıla ait Antik Mısır el yazmaları görünmektedir. Yine M.Ö. 5. yüzyılda Hipokrat, tetanozu “yaralanma sonrası gelişen, kasılmalarla seyreden ölümcül bir hastalık” şeklinde tanımlamıştır. M.S. 5. yüzyılda eski Hindistan’ın Ayurveda metinlerinde de tetanozdan bahsedilmiştir (Thwaites and Loan 2015). Bundan sonra anaerop bakterilerle ilgili uzun bir süre gelişme olmamış, ancak 17. yüzyılda Antonie Van Leeuwenhoek ilk kez kendi geliştirdiği mikroskopuyla gördüğü hareket eden bazı mikropların oksijensiz ortamda canlılığını koruduğunu tarif etmiştir (Saat 2018).

1862 yılında Fransız bilim insanı Louis Pasteur atmosferik oksijen yokluğunda kültürde üretmeyi başardığı bir bakterinin (*Clostridium butyricum*) butirik asiti fermente ettiğini göstermiştir. Bu gelişme Pasteur’ü anaerop bakteriyolojinin öncüsü yapmıştır. Yine Pasteur, Jubert ile birlikte 1877’de *Clostridium septicum*’u kültürde üretmiştir. Pasteur’dan sonra anaerop enfeksiyonlarla ilgili çalışmalar hız kazanmış, 19. yüzyılın sonlarında Veillon ve Zuber kötü kokulu akıntıya neden olan pelvik enfeksiyonlar, beyin apsesi, apandisit gibi bazı enfeksiyonlarda anaerop bakterilerin rol oynadığını göstermiştir. Yine aynı yıllarda botulizm ve tetanoz gibi klostridyal enfeksiyonlar daha iyi tanımlanmış ve Kitasato Şibasaburo *Clostridium tetani*’yi ilk kez izole etmiştir. 20. yüzyılın başlarında Fransa’da ve Almanya’da anaerop spiroketler ve fuziform bakterilerin neden olduğu “fuzospiroketal enfeksiyonlar” tanımlanmış ve bunlarla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Schottmueller’in puerperal sepsisin etkeni olarak anaerop streptokokları tanımlaması ve David

Smith'in 1920'li yıllarda aspirasyon pnömonisi ve akciğer absesinde anaerop bakterilerin büyük rol oynadığını göstermesi anaerop enfeksiyonlarda patogenezi çalışmalarının öncüleri olmuştur. Smith bu çalışmalarında dört farklı anaerop bakterinin akciğer absesinin fizyopatolojisinde rol oynadığını göstererek anaerop enfeksiyonların polimikrobiyal olduğundan ilk defa bahseden bilim insanı olmuştur (Gürler 2011, Bartlett 2015).

GasPak jar (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD) sisteminin geliştirilmesi, anaerop bakterilerin taksonomik sınıflamasının Virginia Polytechnic Institute tarafından gerçekleştirilmesi ve linkomisin, klindamisin, metronidazol gibi antibiyotiklerin anaerop etkinliğinin gösterilmesi 1960'lı yıllardaki önemli gelişmelerdir (Bartlett 2015). Bundan sonra günümüze kadar gelen çalışmalar çoğunlukla yeni anaerop bakterilerin keşfi, anaeroplara yönelik antibiyotikler ve direnç gelişimi ile ilgili olmuştur (Lassmann et al. 2007).

2.2. BAKTERİLERİN OKSİJEN İLE İLİŞKİLERİNE GÖRE SINIFLANDIRILMASI

Bakterileri ilk kez Ferdinand Cohn 1872'de morfolojilerine göre sınıflandırmış; daha sonra günümüze kadar gelen süreçte besin gereksinimleri, patojenik potansiyelleri, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri, genotipik özellikleri esas alınarak bakteriler sınıflandırılmışlardır (Schleifer 2009). Bununla birlikte bakterileri oksijen ve karbondioksit ile olan ilişkilerine göre de sınıflandırmak mümkündür. Bunun temelinde bakterilerin katı ya da sıvı besiyerinde atmosferik hava (%15-21 O₂), karbondioksitli ortam (%10-15 O₂), mikroaerofilik ortam (%4-6 O₂) ve anaerobik ortamdaki (%0 O₂) üreme özellikleri yatmaktadır (Ülger Toprak 2013, Procop et al. 2017). Buna göre 6 grup bakteri vardır:

1. Zorunlu aerop bakteriler: Bu gruptaki bakteriler oksijen konsantrasyonunun fazla olduğu atmosferik hava ve karbondioksitli ortamda iyi ürerler. Mikobakteriler, *Bacillus* ve *Pseudomonas* türleri bu gruptadır (Morris and Schmidt 2013, Procop et al. 2017).

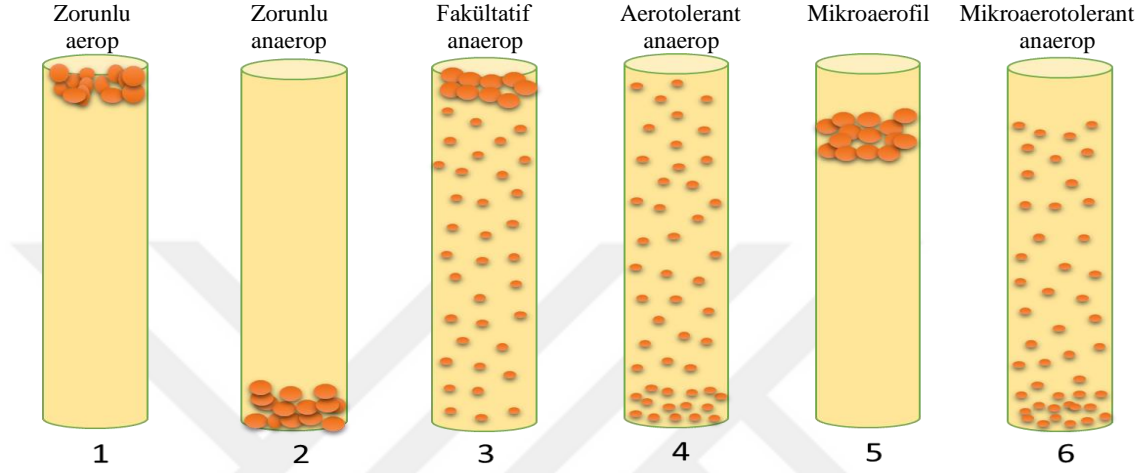
2. Zorunlu anaerop bakteriler: Sadece anaerop ortamda (serbest oksijen yokluğunda) üreyen, diğer ortamlarda üreyemeyen bakterilerdir. Koruyucu enzimleri olmadığından oksijenin ve oksijen radikallerinin toksik etkisi bu bakterileri öldürmektedir. Az miktardaki oksijeni tolere edebilmelerine göre 2'ye ayrılırlar. Birinci gruptakiler %0,5'ten fazla oksijene maruz kalırlarsa ölürlür. Bunlara mutlak zorunlu anaeroplardan denir. Örnek olarak *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* tip B, *Treponema denticola* ve *Selenomonas ruminatum* verilebilir. İkinci gruptakiler (ılımlı zorunlu anaeroplardan) ise %2 ile %8 arasındaki oksijen içeren ortamda üreyebilmektedir. Bunun nedeni olarak, toksik oksijen radikallerine karşı koruyucu olan enzimleri az miktarda ürettikleri düşünülmektedir (Tally et al. 1977). Ancak oksijene maruziyetleri uzun sürerse bu bakteriler de ölmektedir. Klinik örneklerden daha fazla izole edilen anaerop bakteriler olan *Bacteroides fragilis* grubu, pigmentli *Prevotella* ve *Porphyromonas* grupları, *Fusobacterium nucleatum* ve *Clostridium perfringens* bu gruba örnektir (Ülger Toprak 2013, Morris and Schmidt 2013).

3. Fakültatif anaerop (fakültatif aerop) bakteriler: Hem oksijenli hem de oksijensiz ortamda üreyebilen bakterilerdir. Oksijen varlığında enerji elde etmek için aerobik solunumu kullanırlarken, oksijen yokluğunda fermentasyon yoluyla ürerler. Klinik örneklerden izole edilen bakterilerin çoğu bu gruptadır (streptokoklar, stafilokoklar, *Enterobacterales* üyeleri gibi). Bu gruptaki bakteriler aerobik ortamda daha iyi ürerler çünkü oksijen varlığında solunum yoluyla daha fazla enerji elde ederler (Murray et al. 2016).

4. Aerotolerant anaeroplardan: Anaerobik şartlarda iyi üreyen, ancak atmosferik ortamda veya %5-10 karbondioksitli ortamda da zayıf da olsa üreyebilen bakterilerdir. *Lactobacillus* türleri, *Clostridium carnis* ve *Clostridium histolyticum* bu gruptadır (Gajdács et al. 2017).

5. Mikroaerofilik bakteriler: *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* ve bazı *Neisseria* türleri %4-6 oranında oksijen içeren ortamda üremektedirler. Atmosferik havadaki oksijen, bu bakterilerin üremesini inhibe etmektedir. Bu bakterilerin üremesi için ortamdaki gaz karışımı %85 azot, %10 karbondioksit ve %5 oksijen şeklinde olmalıdır (Lagier et al. 2015, Gajdács et al. 2017).

6. Mikroaerotolerant anaeroplur: Bu gruptaki bakterilerin zorunlu anaeroplardan tek farkı mikroaerofilik ortamda da üreyebilmeleridir. Bunlar oksijeni kullanamazlar ancak tolere edebilirler (Zhang et al. 2017). Örnek olarak *Clostridium tertium*, *Bifidobacterium longum* ve *Olsenella umbonata* verilebilir.



Şekil 1. Farklı oksijen yoğunluklarında bakterilerin üreme özellikleri (<https://opentextbc.ca/microbiologyopenstax/chapter/oxygen-requirements-for-microbial-growth/>)

Aerop bakteriler aerobik solunum yoluyla son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanıp 1 molekül glukozu su ve karbondioksit kadar parçalayarak anaeroplardan daha fazla enerji elde ederler. Anaerop bakteriler ise gerekli enzimleri olmadığından dolayı son elektron alıcısı olarak nitrat, sülfat, karbonmonoksit ve bazı alkoller gibi çeşitli organik bileşiklerini kullanarak fermentasyon yaparlar. Oksijenin anaerop bakterilere toksik olmasının yanı sıra, indirgenmesinde oluşan süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil gibi radikaller daha da toksiktir. Aerop bakterilerin bu toksik maddeleri bertaraf etmeye yarayan süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz gibi enzimleri vardır; ancak ılımlı zorunlular dışındaki anaeroplarda bu enzimleri olmadığından bu bakteriler oksijen ürünlerine karşı kendilerini koruyamazlar (Morris and Schmidt 2013, Procop et al. 2017). Toksik oksijen radikallerini ortamdan temizleyen enzimler ve katalizlediği reaksiyonlar aşağıda verilmiştir (Di Meo and Venditti 2020).

$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ (süperoksit dismutaz enzimi katalizler)

$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (katalaz enzimi katalizler)

$H_2O_2 + H_2R \rightarrow 2H_2O + R$ (peroksidaz enzimi katalizler, R herhangi bir elektron vericisidir)

Bir sistemdeki elektronları alma (redüksiyon, indirgenme) ya da verme (oksidasyon, yükseltgenme) eğilimlerine redoks potansiyeli (Eh) denir. Birimi voltur (V). Sağlam dokuların Eh'si +0,12 mV civarındadır. Anaerop ortamların sağlanması için bu potansiyelin düşük değerlerde olması gerekir. Örneğin apse gibi anaerop bakterilerin üremesine elverişli ortamlarda ya da anaerop besiyerlerinde bu potansiyel -400 mV civarındadır. Bunun yanında anaerop bakterileri kültürde üretebilmek için besiyerlerine ortamın redoks potansiyelini düşüren indirgeyici özellikteki tiyoglikolat, L-sistein gibi maddeler eklenir (Bilgehan 2008). Ancak anaerop bakterilerin üretilmesi için ortamın oksijenden arındırılmasının, düşük Eh sağlanmasından daha önemli olduğu gösterilmiştir (Walden and Hentges 1975).

2.3. ANAEROP BAKTERİLERİN SINIFLANDIRILMASI

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli testler ile bakterilerin sınıflandırılması netlik kazanmış ve anaerop bakterilerin dahil olduğu taksonlar belirlenmiştir. Bu çalışmalar günümüzde halen devam etmekte olup; sınıflamaya yeni bulunan bakteriler eklenmekte, bazılarının cins ya da tür isimleri değişmekte ve bazıları bulunduğu taksondan çıkarılıp başka taksona ilave edilerek taksonomi güncellenmeye devam etmektedir (Finegold 2004). Ancak halen gram yöntemiyle boyanma, spor oluşturma, morfolojik görünüm gibi fenotipik özelliklerle yapılan geleneksel sınıflandırma güncelliğini korumaktadır (Procop et al. 2017). Klinik örneklerde daha sık karşılaşılan anaerop bakteriler Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. Klinik örneklerde sık karşılaşılan anaerop bakterilerin morfolojilerine göre sınıflandırılması (Lin et al. 2010, Procop et al. 2017, Shenoy et al. 2017)

Cins	Gram Negatif Basiller
<i>Bacteroides</i>	<i>B. fragilis, B. thetaiotaomicron, B. ovatus, B. vulgatus</i>
<i>Bilophila</i>	<i>B. wadsworthia</i>
<i>Dialister</i>	<i>D. micraerophilus</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>F. necrophorum, F. nucleatum, F. varium</i>
<i>Porphyromonas</i>	<i>P. asaccharolyticus, P. endodontalis, P. gingivalis</i>
<i>Prevotella</i>	<i>P. bivia, P. denticola, P. disiens, P. intermedia, P. loeschii, P. melaninogenica, P. nigrescens</i>
<i>Treponema</i>	<i>T. denticola</i>
Gram Pozitif Koklar (GPAK)	
<i>Anaerococcus vaginalis, Finegoldia magna, Parvimonas micra, Peptostreptococcus anaerobius, Peptoniphilus asaccharolyticus, anaerop stafilokoklar ve streptokoklar</i>	
Gram Pozitif Sporlu Basiller	
<i>Clostridium</i>	<i>C. botulinum, C. clostridioforme, C. difficile, C. histolyticum, C. novyi, C. perfringens, C. ramosum, C. septicum, C. sordelli, C. tetani</i>
Gram Pozitif Sporsuz Basiller	
<i>Actinomyces israelii, Atopobium rimae, Bifidobacterium spp., Cutibacterium acnes (eski adı Propionibacterium acnes), Eggerthia cateniformis, Eubacterium spp., Lactobacillus spp., Mobiluncus spp., Propionibacterium propionicum</i>	
Gram Negatif Koklar	
<i>Veillonella</i>	<i>Veillonella dispar, Veillonella parvula</i>

2.4. NORMAL İNSAN MİKROBİYOTASINDA BULUNAN ANAEROP BAKTERİLER

İnsan vücudunda bulunan bakterilerin büyük çoğunluğunu anaeroplara oluşturur. Gastrointestinal sistem en çok buldukları bölgedir. Ağız boşluğu ve kolondaki mikrobiyotanın %90'dan fazlası anaerop bakterilerdir. Dışkıının bir gramında 10^{10} - 10^{12} koloni oluşturan birim (CFU) bakteri bulunmaktadır. Anaeroplara aeroplardan 1000 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Deri ve müköz membranlar, üst solunum yolu, kadın genital sistemi ve üretrada da bulunarak önemli fonksiyonlar üstlenirler. Örneğin müköz membranları eksojen patojenlere karşı koruyarak kolonizasyon direnci oluştururlar. Gastrointestinal kanalda safra gibi toksik maddelerin metabolize edilmesinde, immün sistemin gelişiminde, vitamin K ve kısa zincirli yağ asitlerinin sentezlenmesinde etkin rol oynarlar (Belizario and Napolitano 2015, Gajdacs et al. 2017). Normal insan mikrobiyotasında yer alan anaerop bakterilerin bir kısmı Tablo 2'de görülmektedir.

Tablo 2. İnsan mikrobiyotasında bulunan anaerop bakteriler (Lobo et al. 2016, Procop et al. 2017)

Ağız Boşluğu ve Üst Solunum Yolları	Mide	İnce Barsak	Kalın Barsak	Kadın Genital Sistemi	Üretra	Deri
<i>Prevotella</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Cutibacterium</i>	<i>Cutibacterium</i>
<i>Porphyromonas</i>		<i>Lactobacillus</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Porphyromonas</i>	GPAK	GPAK
<i>Bacteroides</i>			<i>Fusobacterium</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides</i>	
<i>Fusobacterium</i>			GPAK	GPAK	<i>Prevotella</i>	
GPAK*			<i>Clostridium</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Fusobacterium</i>	
<i>Veillonella</i>			<i>Eubacterium</i>	<i>Eggerthia</i>		
<i>Actinomyces</i>			<i>Eggerthia</i>	<i>Clostridium</i>		
<i>Cutibacterium</i>			<i>Bifidobacterium</i>	<i>Veillonella</i>		
			<i>Cutibacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>		

*: Gram pozitif anaerop koklar

2.5. ANAEROP BAKTERİLERİN PATOGENEZ MEKANİZMALARI

Tarihsel süreç içerisinde anaerop bakterilerle yapılan ilk çalışmalar eksojen enfeksiyon oluşturan *Clostridium* türlerine yoğunlaşmıştır. Ancak zamanla yeni anaerop bakteriler keşfedilmiş, mikrobiyota çalışmalarının da hız kazanmasıyla birlikte endojen anaeroplara fırsatçı patojen oldukları ve anaerop enfeksiyonlara daha fazla yol açtıkları anlaşılmıştır (Kıyan 1999). Anaerop bakterilerle çalışan laboratuvar sayısının artması sonucu bu etkenlerin gözden kaçmaması ve maligniteler, diabetes mellitus, vaskülitler, steroid kullanımı gibi sebeplerle immün sistemin bozulması sonucu bakterilerin fırsatçı patojen haline geçmesi ile mikrobiyoloji laboratuvarlarında anaeroplara artık daha sık izole edilmektedir (Finegold 2000).

Doku yıkımı, obstrüksiyon, staz, oksijen basıncının azalması, yanık, yabancı cisim gibi durumlar redoks potansiyelini düşürerek anaerop bakterilerin çoğalması için elverişli ortam yaratırlar. Bunun yanında çeşitli nedenlerle immün sistemin bozulması, travma ve cerrahi sonucunda anatomik bariyerin bozulması, bakterilerin virulans özellikleri anaerop enfeksiyonların patogeneze katkıda bulunmaktadır. Anaerop enfeksiyonlar sıklıkla polimikrobiyaldir. Enfeksiyona katılan aerop ya da fakültatif anaerop bakteriler ortamın oksijen basıncını ve redoks potansiyelini düşürerek anaeroplara üremesine zemin oluşturur (Gürler 2001, Finegold 2004).

Anaerop bakteriler çoğunlukla salgıladıkları toksinler ve enzimlerle enfeksiyona yol açarlar. *C. perfringens*'in major toksini Fosfolipaz C (alfa toksini) eritrositler, endotel hücreleri ve kas hücrelerinin membranında bulunan lesitin ve sfingomiyelini parçalar. Salgıladığı başka bir toksin olan enterotoksin ise besin zehirlenmesine yol açar. *C. tetani* hem GABA ve glisin salınımını engelleyen tetanospazmin salgılayarak spastik paraliziyeye neden olur, hem de tetanolizin enzimi ile eritrositleri hemolize uğratar. *C. botulinum* nörotoksini ile sinir-kas kavşağında asetilkolin salınımını engelleyerek gevşek paraliziyeye yol açar. *C. difficile*'nin salgıladığı Toksin A ve Toksin B antibiyotikle ilişkili diyare, pseudomembranöz kolit ve toksik megakolon ile ilişkili bulunmuştur (Aronoff 2013, Gajdacs et al. 2017, Guo et al. 2020).

Gram negatif basillerin majör virülans faktörü hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritlerdir. *Fusobacterium* türleri hariç olmak üzere, gram negatif anaerop basillerde ise yapısal farklılıktan dolayı endotoksin aktivitesi daha zayıftır. *B. fragilis* ve *Prevotella* türlerinin sahip oldukları kapsül lökositler tarafından bakterinin fagosite edilmesini önler. Çeşitli fimbriyal ve nonfimbriyal adezinleri konak dokuya tutunmayı sağlar. Yine bu bakteriler ortama kollajenaz, fibrinolizin gibi çeşitli proteazlar salgılayarak ekstraselüler matriksi parçalar ve dokularda yayılma fırsatı bulur. *B. fragilis*'in kapsülünden salınan süksinik asit lökosit kemotaksisini inhibe ederek dokularda apse oluşumuna yol açar. Yine bu bakterinin genetik materyalindeki patojenite adası (BfPAI) üzerinde bulunan *bft* geninin yapımını kodladığı enterotoksin yetişkinlerde diyareye neden olmaktadır (Duerden 1994, Isar et al. 2006).

2.6. ANAEROP BAKTERİ ENFEKSİYONLARI

Anaerop bakterilerin etken olduğu enfeksiyonlar vücuttaki birçok bölgede görülebilir. En sık görülen klinik durumlar arasında intraabdominal apse, sekonder peritonit, bakteriyemi ve septisemi, nekrotizan selülit, aspirasyon pnömonisi, akciğer apsesi, beyin apsesi, ağız ve diş enfeksiyonları, diyabetik ayak, kadınlarda pelvik apseler ve diğer organ apseleri yer almaktadır. Bunların tamamına yakınında etken endojen mikrobiyota üyeleri olmaktadır (Gajdács et al. 2017, Procop et al. 2017).

Klinik olarak bazı durumlarla karşılaşıldığında anaerop enfeksiyonlar düşünülmelidir. Bunlar arasında lezyonda rahatsız edici koku varlığı ve apse oluşumu başta olmak üzere; koyu renkli eksüda varlığı, dokuda gaz oluşması, dokunun kanlanması bozulması, ısırık sonrası gelişen enfeksiyonlar, maligniteli hastalarda enfeksiyon oluşması, mikroskopik olarak gram boyamada çok sayıda bakteri görülmesine rağmen kültürde üremenin olmaması ve sadece aerop bakterilere karşı etkinliği olan antibiyotiklerle enfeksiyonun gerilememesi sayılabilir. Ancak bunların varlığı anaerop bakteri enfeksiyonlarını düşündürse de kesin gösterge değildir (Gürler 2001, Ülger Toprak 2013, Gajdács and Urbán 2020).

Klinik örneklerden en çok izole edilen anaerop bakteriler gram negatif basillerdir. En sık görülen anaerop enfeksiyonlar ise intraabdominal apselerdir. Bunlardan en çok izole edilen bakteri ise *B. fragilis*'tir (Procop et al. 2017). Ancak bu enfeksiyonların çoğunlukla polimikrobiyal olduğu unutulmamalıdır. *B. fragilis* aynı zamanda anaerop bakteriyemilerden de en sık sorumlu olan etkidir (Wexler 2007, Cheng 2009). Anaerop enfeksiyonlara sıkça yol açan diğer gram negatif basiller *B. fragilis* grubunun diğer üyeleri, pigmentli *Prevotella* ve *Porphyromonas* türleri ve kedi-köpek ısırık yaralarından en sık izole edilen *Fusobacterium nucleatum*'dur. Gram pozitif sporsuz basillerden *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Eggerthella*, *Propionibacterium* ve *Lactobacillus* türleri klinik örneklerden izole edilmekle birlikte, birkaçı dışında enfeksiyonlardaki rolleri hakkında bilgiler sınırlıdır (Jenkins 2001, Gajdacs et al. 2017, Procop et al. 2017, Shenoy et al. 2017).

Finegoldia, *Peptostreptococcus*, *Anaerococcus*, *Parvimonas* ve *Peptoniphilus* türleri klinik örneklerden en sık izole edilen gram pozitif anaerop koklardır. Çoğunlukla normal mikrobiyota elemanı olan bu bakteriler çeşitli nedenlerle immün sistem bozulduğunda anaerop enfeksiyonlara yol açarak deri ve yumuşak doku, kadın genital sistemi ve ağız boşluğundan izole edilmektedirler. Gram pozitif anaerop kokların yol açtığı enfeksiyonların genellikle polimikrobiyal olduğu bilinmektedir (Murdoch 1998, Shenoy et al. 2017).

Eksojen kaynaklı anaerop enfeksiyonlar, endojen olanlara göre daha az görülmektedir. Bu enfeksiyonlar arasında nozokomiyal diyare, tetanoz, botulizm, gastroenterit, gazlı gangren ve septik abortus sayılabilir. Eksojen enfeksiyonlara çoğunlukla gram pozitif sporlu basiller olan *Clostridium* türleri yol açmaktadır ve klinik örneklerden en sık izole edilen tür *C. perfringens*'tir. (Procop et al. 2017, Guo et al. 2020).

2.7. ANAEROP ENFEKSİYONLARDA ÖRNEK ALINMASI VE LABORATUVARA TAŞINMASI

2.7.1. Örnek Alınması

Anaerop enfeksiyonların doğru tanısı ancak klinik örneklerin uygun koşullarda alınması ve vakit kaybetmeden uygun koşullarda laboratuvara transfer edilmesi ile mümkün olmaktadır. Bunu sağlamanın başlıca yolu klinisyenle mikrobiyoloğun sağlıklı bir iletişim içinde olmasıdır. Anaerop enfeksiyonların doğru tanısı ve etkenin izolasyonu için dikkat edilmesi gereken en önemli basamak örneğin alımı ve transferidir. Öncelikle normal mikrobiyotaya temas etmeden doğrudan enfeksiyon bölgesinden örnek alınmalıdır. Bu nedenle oksijen ile temas nedeniyle balgam, yüzeysel üst solunum yolu örnekleri, alt solunum yolu örneklerinin çoğu, idrar (suprapubik aspirasyon ile alınan hariç), yara kabuğu, mide ve ince barsak örnekleri, fistül ve kolostomilerin ağzından alınan örnekler, tüm sürüntü örnekleri ve formalin içinde gönderilen örnekler anaerop enfeksiyonların tanısında uygun değildir (Kıyan 1999, Jousimies-Somer et al. 2002, Ülger Toprak 2013). Enfeksiyonun yerine göre anaerobik kültür için uygun olan örnekler Tablo 3'te görülmektedir.

Anaerobik kültür için en uygun örnekler; hava ile temas etmeden aspirasyon işlemiyle alınan apseler, steril olan bölgelerden alınan sıvılar ve doku biyopsi örnekleridir. Örnek alınırken deri ve müköz membrandaki mikrobiyota üyelerinin kontaminasyonunu önlemek için öncelikle cilt yüzeyi %10'luk povidon iyot ile temizlenmeli, sonrasında ise %70'lik etil alkol veya izopropil alkol kullanılarak povidon iyotun uzaklaştırılması gereklidir (Garcia 2010, Procop et al. 2017).

Tablo 3. Anaerop enfeksiyonlarda kültür için uygun olan örnekler (Kıyan 1999, Garcia 2010)

Abdominal bölge	Parasentez ile steril olarak alınan periton sıvısı, cerrahi işlem ile alınan apse ve derin aspirasyon materyali
Deri ve yumuşak doku	Yüzey dekontaminasyonu yapılarak alınan biyopsi veya derin aspirasyon materyali
Kemik ve eklem	Eklem aralığından elde edilen aspirasyon materyali, kemik biyopsisi
Kalın barsak	Gaita (Sadece <i>C. difficile</i> veya <i>C. botulinum</i> 'un etken olduğu düşünülen durumlarda kültür veya toksin çalışmaları için)
Kadın genital sistemi	Cerrahi ile elde edilen örnekler, laparoskopi örnekleri, kuldosentez ile alınan periton sıvısı, rahim içi araç (RIA) (<i>Actinomyces</i> spp. için)
Merkezi sinir sistemi	Apse materyali, biyopsi örnekleri, BOS
Akciğer ve plevra	Plevra sıvısı, perkütan olarak alınan akciğer biyopsisi örneği, korunmuş fırçayla alınan transtrakeal aspirasyon materyali, fiberoptik bronkospla alınan örnekler
Ağız boşluğu, kulak, burun, boğaz ve paranazal sinüsler	Apse aspirasyon ve biyopsi materyalleri, orta kulak aspiratı, sinüslerden kateter ile alınan aspirat örnekleri
Üriner sistem	Suprapubik aspirasyonla alınan idrar

2.7.2. Örneklerin Laboratuvara Taşınması

Anaerop bakterilerin oksijenle teması onlar için öldürücü olduğundan, alınan örneklerin mümkün olan en kısa sürede mikrobiyoloji laboratuvarına taşınması gereklidir. Bu süre klinik örneğin hacmine ve özelliğine göre değişmektedir. Büyük hacimli ve püy içeren örneklerde bulunan anaerop bakteriler birkaç saat canlı kalabilmektedir. Bu örnekler sızdırmaz kapaklı kaplar içinde gönderilmelidir. Örnek miktarı az ise anaerop transport sistemleri ile iletilmelidir, ancak transport besiyeri yoksa hasta başında tiyoglikolatlı buyyon gibi sıvı anaerop besiyerlerine inoküle edilmesi önerilmektedir. Örnek mutlaka svabla alınacaksa poliüretandan yapılmış olanlar tercih edilmeli ve yine anaerobik transport besiyeri içeren bir kaptaki laboratuvara nakledilmelidir. Transport işlemi gecikme olursa örnek oda sıcaklığında bekletilmeli, aşırı sıcak ya da soğuğa maruz kalmaları önlenmelidir. Sağlık görevlilerinin yaralanması riski ve örneğin dışarıya sızma tehlikesi bulunduğundan örneklerin enjektör içinde (iğnesi eğilerek vb.) taşınması risk taşımaktadır. Mümkün oldukça anaerop transport besiyeri tercih edilmelidir (Hindiyeh et al. 2001, Garcia 2010, Ülger Toprak 2013).

2.8. LABORATUVARDA ÖRNEKLERİN İŞLENMESİ

Anaerop enfeksiyon şüphesi taşıyan klinik örnekler bazı işlemlerden geçirilerek anaeroplara izolasyon şansını artırmak mümkün olmaktadır. Bu amaçla fazla miktarda püy içeren örnekler vortekslenerek, doku parçaları ise sıvı besiyerlerine aktarılarak örneklerin homojenize edilmesi tavsiye edilmektedir (Garcia 2010).

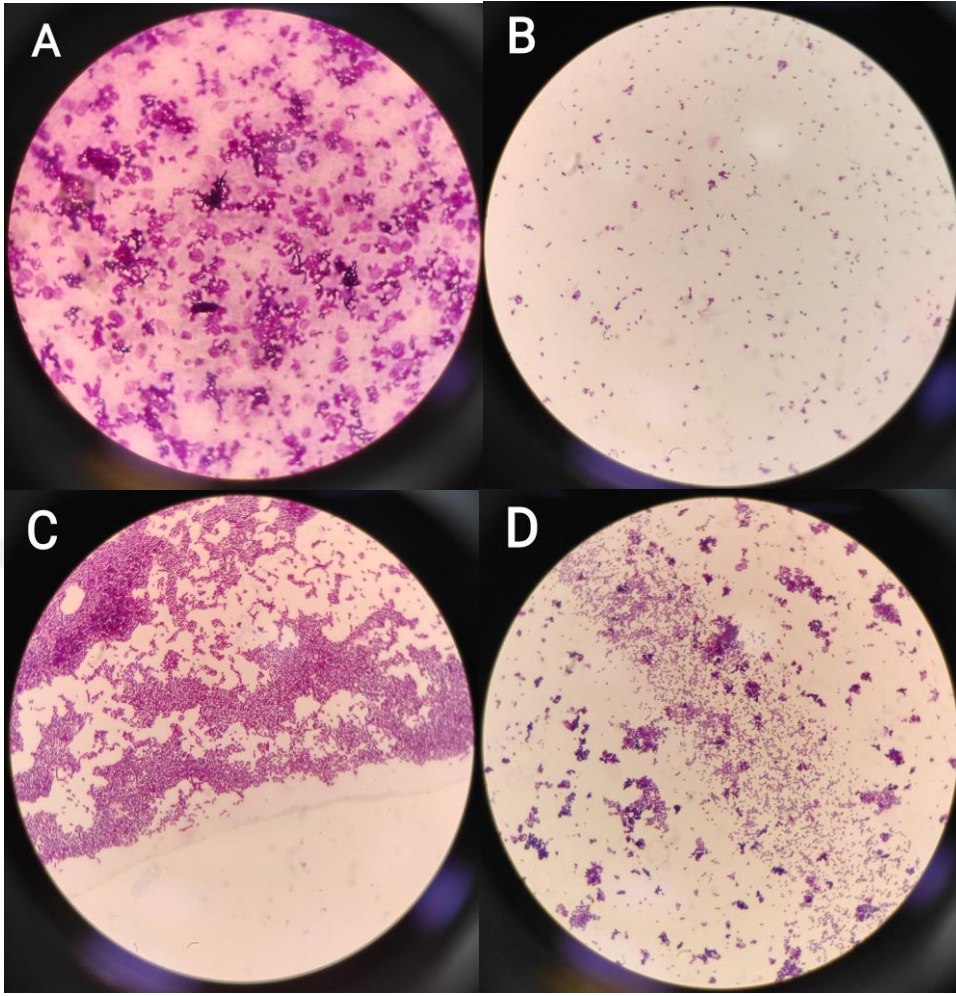
2.8.1. Direkt İnceleme

Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen diğer klinik örneklerde olduğu gibi, anaerop enfeksiyon şüpheli örneklerin de öncelikle makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmesi gerekmektedir. Makroskopik incelemede klinik örneğin kötü kokması, püy içermesi, kanlı ve nekrotik görüntüde olması, sülfür granülleri varlığı anaerop enfeksiyon açısından şüphe uyandırmalıdır. Kültür için ekim ile birlikte örnekten hazırlanan preparatın gram yöntemiyle boyanmasından sonra yapılacak mikroskopik incelemede ise çok sayıda polimorf nüveli lökositlerle birlikte karışık bakteri görülmesi bu şüpheyi daha da artıracaktır. Kültürü yapılamayan ve ışık

mikroskopisinde görülemeyen *Treponema* türleri karanlık alan mikroskopisinde incelenmelidir (Johnson et al. 1995, Ülger Toprak 2013, Procop et al. 2017).

Anaerop şüpheli örneklerde gram boyama yapılırken kristal viyole ve lügol basamaklarından sonra fiksasyon (tespit) amacıyla hücresel yapıların korunmasına olanak sağladığından dolayı metanol tercih edilmelidir. Yine zıt boya olarak bazı gram negatif anaeroplara boyasını artırmak için safranin yerine sulu fuksin tavsiye edilmektedir (Garcia 2010).

Gram yöntemiyle boyanmış preparatların mikroskopta incelenmesi anaerop bakterilerin tanısında çok önemli bir yere sahiptir. Bu sayede bakterilerin morfolojik özellikleri belirlenmekte, sahip oldukları spor yapıları gözlenebilmekte, inflamatuvar hücrelerin varlığı tespit edilebilmektedir (Johnson et al. 1995). Anaerop bakterilerin morfolojileri çok çeşitlidir. *Bacteroides* türleri pleomorfik, uç ya da orta kısımlarında şişlikler olabilen, gram negatif kısa basiller olarak görünmektedir. *Prevotella* ve *Porphyromonas* türleri de benzer şekilde değişik boyutlarda gram negatif kokobasillerdir. Gram negatif basiller genellikle gram boyama yöntemi ile soluk boyanmaktadır (Garcia 2010). *Fusobacterium* türleri ince, uzun, uçları sivri, iğ şeklinde, düzensiz boyanan gram negatif basillerdir. Ancak *F. necrophorum* farklı olarak pleomorfik görünümündedir, uçları sivri değildir. Gram pozitif sporlu basil olan *Clostridium* cinsinin bazı üyeleri gram ile negatif boyanmaktadır (*C. ramosum* ve *C. perfringens*). *C. perfringens* santral ya da subterminal spor yapısına sahip olduğu halde, neden olduğu myonekrozlu örnekten hazırlanan preparat mikroskopta incelendiğinde sporsuz görünmektedir ve bu örnekte inflamatuvar hücreye de rastlanmaz. Diğer gram pozitif anaerop basillerden *Actinomyces* türleri dallanmış yapıda, *C. acnes* difteroid görünümündedir. Gram pozitif anaerop kokların içerisinde *F. magna* diğerlerine göre daha iri hücreler olarak göze çarpmaktadır. Gram boyamanın bir faydası da klostridyal myonekroz gibi hayatı tehdit eden durumlarda hızlı tanı açısından klinisyene ön rapor verme imkânı tanımasıdır (Cohen-Poradosu and Kasper 2015, Procop et al. 2017).



Resim 1. Anaerop bakterilerin gram boyama görüntüleri (bu tez çalışmasından)

A: Dallanmış gram pozitif basiller, **B:** Pleomorfik görünümlü gram negatif kokobasiller, **C:** Koloniden hazırlanan preperatta gram negatif basiller, **D:** Küçük gram negatif koklar.

2.8.2. Anaerop Bakterilerin Kültürünün Yapılması

Tüm bakteriyel enfeksiyonlarda olduğu gibi anaerop enfeksiyonların da kesin tanısı klinik örneğin kültürünün yapılarak bakterinin veya bakterilerin izole edilmesiyle konmaktadır. Anaerop bakterilerin izole edilmesi zor, zahmetli ve zaman alıcı bir süreçtir. Aerop olarak yapılan kültürden bazı farklılıkları vardır. Öncelikle kültür için kullanılacak besiyerleri günlük olarak hazırlanmalıdır, çünkü anaerop besiyerleri kısa sürede tazeliğini yitirmekte ve bakterilerin izolasyon şansı azalmaktadır. Anaerop bakteriler üremek için hemin, vitamin K₁, L-sistein gibi faktörlere ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle besiyerleri mutlaka bunları içermelidir. Ayrıca anaerop

bakterileri üretmek için hazırlanacak besiyerlerine hem besleyici özelliğini artırmak hem de hemoliz reaksiyonunu belirginleştirmek amacıyla %5 oranında koyun kanı ilave edilmelidir. Anaerobik kültür işlemlerinin yanı sıra tüm örneklerin aerobik kültürleri de eş zamanlı olarak yapılmalıdır (Ülger Toprak 2013, Procop et al. 2017).

Anaerob bakterileri izole etmede kullanılan besiyerleri genel üretim besiyerleri ve seçici besiyerleri olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Anaerob bakterilerin üretildiği çeşitli besiyeri örnekleri Tablo 4’te görülmektedir.

Tablo 4. Anaerob bakterilerin primer izolasyonunda kullanılan temel besiyerleri (Finegold 2000, Garcia 2010, Procop et al. 2017)

Genel Üretim Besiyerleri	Seçici Besiyerleri
CDC anaerob kanlı agar	Anaerob feniletıl alkol kanlı agar (PEA)
Brusella kanlı agar	Anaerob kanamisin-vankomisin hemolizli kanlı agar (KVLB)
Schaedler kanlı agar	Anaerob paromomisin-vankomisin kanlı agar (PV)
Columbia kanlı agar	Sikloserin-sefoksitin fruktoz agar (CCFA)
Beyin-kalp infüzyon kanlı agar	<i>Bacteroides</i> Safra Eskülin Agar (BSE)
Fastidious anaerob agar	Kolistin-nalidiksik asit kanlı agar
Zenginleştirilmiş tiyoglikolatlı besiyeri	Yumurta sarılı agar (EYA)
Kıymalı glukozlu sıvı besiyeri	

2.8.2.1. Genel Üretim Besiyerleri

Genel üretim besiyerleri tüm anaerobik bakterilerin kolayca izole edilebildiği seçici olmayan kanlı agar besiyerleridir. Ancak bunlar anaerop bakterilerin üremesi için spesifik değildir. Zorunlu aerop ve fakültatif anaerop bakterilerin birçoğu bu besiyerlerinde kolayca üremektedirler. Ayrıca kültür ekimi yapılırken örnekler aerop besiyerlerine de ekilmeli, inkübasyon süresi sonunda üreme özellikleri karşılaştırılmalıdır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıkça kullanılan genel üretim besiyerleri Tablo 4’te görülmektedir. ADT için referans yöntem olan agar dilüsyon işleminde brusella kanlı agar tercih edilmektedir. Tiyoglikolatlı sıvı besiyeri anaerop enfeksiyon şüphesi olup katı besiyerinde üreme olmadığında, yeniden pasaj yapılarak izolasyon şansını artırmak için kullanılan yedek besiyeridir. Aynı zamanda *Actinomyces* gibi yavaş üreyen anaeroplara kültürü için yararlıdır. Kıymalı sıvı besiyeri ise daha çok anaeroplara stok kültürünün yapılmasında ve *Clostridium* türlerinin üretilmesinde kullanılmaktadır. Tiyoglikolat ve kıyma iyi birer indirgeyicidir ve ortamdaki oksijenin giderilmesini sağlar. Bu amaçla glutatyon, sodyum formaldehit sulfoksilat ve L-sistein klorhidrat da kullanılabilir. Stok amacıyla skim milk medium da yaygın olarak kullanılmaktadır (Bilgehan 2009, Garcia 2010, Procop et al. 2017).

2.8.2.2. Seçici Besiyerleri

Anaerop bakterilerin izolasyon şansını artırmak için genel üretim besiyerlerinin yanında seçici besiyerlerine de ekim yapılmaktadır. Bunlar içerdikleri antibiyotikler ve çeşitli kimyasal maddeler sayesinde sadece belli anaeroplara üremesine izin vermekte, diğer anaerop ve aerop bakterilerin üremesi inhibe olmaktadır (Ülger Toprak 2013).

PEA’da bulunan feniletal alkol *Proteus* türlerinin yayılma hareketini ve gram negatif fakültatif anaeroplara çoğunun üremesini inhibe ederek, karışık bakteri içeren örneklerde anaerop bakterilerin seçici olarak üremesini sağlamaktadır. Gram pozitif bakteriler bu inhibisyonla etkilenmemektedir. KVLB de aynı amaçla kullanılmaktadır. Farklı olarak gram pozitif bakterilerin üremesi vankomisin tarafından inhibe edilmekte ve *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonella* türlerinin seçici olarak üremesi sağlanmaktadır (Rosenblatt 1997, Procop et al. 2017).

CCFA besiyeri antibiyotikle ilişkili diyarenin başlıca etkeni olan *C. difficile*'nin dışkı örneklerinden seçici izolasyonunda kullanılmaktadır. İçerdiği antibiyotikler barsak mikrobiyotasını inhibe etmektedir. Ancak bazı *Enterobacterales* takımı üyeleri ve stafilokoklar bu besiyerinde üreyebilmektedir (Procop et al.2017). Ancak besiyerinde buzlu cam görüntüsü oluşturan bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonun kesin tanısında başka tanımlama yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Garcia 2010).

BSE agar safraya dirençli olan *B. fragilis* grubu üyelerinin ve *B. wadsworthia*'nın seçici olarak izolasyonunda kullanılmaktadır. Antibiyotik olarak içerdiği gentamisin gram negatif aerop bakterilerin üremesini inhibe etmektedir. Gram pozitif bakterilerin birçoğu da safraya duyarlı olduğundan bu besiyerinde üreyemezler. Ayrıca eskülinin hidrolize edilmesi türlerin birbirinden ayırmasına yardımcı olur (Garcia 2010, Procop et al. 2017).

Günümüzde otomatize sistemlere uyumlu anaerop kan kültür şişeleri de kullanılmaktadır. Bunlar Schaedler broth, Columbia broth, tiyoglikolat medium, Wilkins-Chalgren broth gibi besiyerlerine vakum altında CO₂ eklenerek hazırlanan anaerop sistemlerdir. BacT/Alert FN (bioMérieux, Durham, NC, USA), Bactec Plus Anaerobic/F, Bactec Lytic/10 Anaerobic F (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), ESP 80N, ESP 40N (Difco Laboratories, Detroit, USA) gibi otomatize sistemler bakteriyemi ve sepsisemi tanısında kullanılmaktadır (Roh et al. 2012).

2.8.2.3. Klinik Örneklerin Besiyerlerine Ekimi ve İnkübasyon

Anaerop enfeksiyonların doğru tanısı klinisyenin örneği normal mikrobiyota ile kontamine etmeden uygun şekilde alması, vakit kaybetmeden uygun bir taşıma sistemiyle örneğin laboratuvara nakledilmesi ve laboratuvarda işlenmesi ile bu sırada oksijenle temasın minimum seviyede tutulması sayesinde mümkün olmaktadır. Anaerop bakterilerin diğerlerine göre daha yavaş üremeleri, saf kültür elde etmenin zor olması ve tanımlama testlerinin zaman alıcı ve maliyetli olması nedeniyle anaerop bakterilerle çalışan mikrobiyoloji laboratuvarı az sayıdadır (Kıyan 1999).

Anaerop enfeksiyon şüphesi varlığında kültür için gelen klinik örneğin hemen ekiminin yapılması gerekmektedir. Örnek pürülan karakterde ise 1-2 damla, değilse 3-4 damla alınarak katı besiyerlerine inoküle edilmelidir. Ekim ve inkübasyon

sırasında meydana gelebilecek olumsuzluklar nedeniyle tüm örneklerin yedek sıvı besiyerlerine de ekiminin yapılması ve gerektiğinde yeniden bu besiyerlerinden işlemlerin tekrar başlatılması tavsiye edilmektedir (Garcia 2010).

Laboratuvarlara gelen örnek sayısı ve laboratuvarların ekonomik olanaklarına göre inkübasyon sistemleri farklılık göstermektedir. Az sayıda laboratuvar hava ile teması olmadan örneklerin işlenmesine izin veren, kapalı bir sistem olan anaerop eldivenli kabin kullanarak anaerop bakterileri başarıyla izole edebilmekte; diğer laboratuvarlarda ise bu amaçla en çok anaerop kavanoz (jar) ve plastik poşetler tercih edilmektedir (Engelkirk and Engelkirk 2007, Procop et al. 2017).

Anaerop kabinlerde anaerop koşullar palladyum katalizörü vasıtasıyla %85 N₂, %10 H₂, %5 CO₂ sabit gaz karışımı devridaim yapılarak sağlanır. Besiyerleri genellikle kabin içinde ayrı bir inkübatörde tutularak inkübe edilir. Anaerop kavanozlarda metal bir kapak, vana ve bazılarında basınç göstergesi bulunur. Bunlarda anaerobik koşullar tek kullanımlık H₂-CO₂ jeneratörü veya boşaltmalı-yer değiştirmeli sistemle %80-90 N₂, %5-10 H₂, %5-10 CO₂ gaz karışımı olacak şekilde sağlanır. Kavanoz sisteminin bir modifikasyonu olarak geliştirilen Anoxomat (Mart Microbiology, Lichtenvoorde, Hollanda) otomatize bir boşaltmalı-yer değiştirmeli sistemle hem anaerop hem de mikroaerofil ortam sağlayabilme özelliğinde kullanımı kolay bir sistemdir. Anaerop plastik poşetler de palladyum katalizör granülleri veya demir tozları kullanılarak anaerop ortam oluşturan, mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan sistemlerdir. Az sayıda plağın inkübe edilmesinde diğer yöntemlere göre daha pratiktir. Ayrıca poşetler şeffaf olduğundan plaklardaki üremenin anaerop ortam bozulmadan gözlenebilmesi bu sistemin bir avantajıdır. Plaklar ve gaz paketleri poşetlere yerleştirildikten sonra, poşetlerin ağzı hava geçişine izin vermeyecek şekilde plastik çubuklarla veya ısıtılarak sıkıca kapatılmalıdır. Gaz paketlerinde bulunan sodyum borohidrür H₂, sodyum bikarbonat ise CO₂ taşıyıcısıdır. Her üç sistemde de gaz karışımındaki hidrojen, oksijenle reaksiyona girerek onu tüketir ve anaerop ortam sağlanmış olur (Brazier and Smith 1989, Garcia 2010, Procop et al. 2017). Yaygın olarak kullanılmasa da ilginç bir yöntem olarak *Serratia marcescens* ve *Bacillus subtilis* gibi aerop bir bakteri besiyerine ekilerek de anaerop ortam oluşturulabilmektedir. Bu yöntemde aerop bakteriler solunum yoluyla

ortamdaki oksijeni sarf etmekte ve birlikte bulunduğu anaerop bakterilerin üremesi için uygun bir ortam sağlanmış olmaktadır (Finegold 1993, Bilgehan 2009). İnkübasyon sistemi olarak hangisi kullanılırsa kullanılsın oksidasyon-redüksiyon indikatörüyle anaerop koşullar kontrol edilmeli, sistemde oksijen varlığı fark edilirse derhal müdahale edilmelidir. Bu amaçla metilen mavisi ya da resazurin boyaları kullanılmakta, anaerop koşullar oluştuğunda renksiz olan bu boyalar sisteme oksijen karışırsa okside olarak renk değiştirmektedir (Bacic and Smith 2008, Speers et al. 2009, Garcia 2010).

Ekim yapılan besiyerleri 35-37°C'de anaerop kabin kullanılıyorsa en az 24 saat, diğer sistemlerde ise en az 48 saat inkübe edilmelidir. *Bacteroides* ve *Clostridium* türleri için bu süre yeterli olmaktadır. Ancak *P. anaerobius*, *A. israelii*, *Prevotella* ve *Porphyromonas* türleri gibi yavaş üreyen anaeroplardan şüpheleniliyorsa inkübasyon süresi birkaç gün daha uzatılmalıdır. Acil durumlarda aynı örnekten iki set hazırlanarak farklı sürelerde inkübasyon da yapılabilmektedir (Garcia 2010, Procop et al. 2017).

2.8.3. İnkübasyon Sonrası Kültürlerin İncelenmesi

Klinik örneğin makroskobik görünümü, kokusu, gram boyalı preperatın mikroskobik bulguları anaerop enfeksiyonu işaret etmesine rağmen kültürde üreme saptanmadıysa yedek sıvı besiyerlerinden yeniden ekim yapılması gerekmektedir. Çok fazla sayıda farklı koloni görülüyorsa, mikrobiyota ile kontamine olmuş anlamına gelmektedir. Bu durumda klinisyenle iletişime geçmek en doğru yaklaşım olacaktır (Finegold 2000).

Üreme varlığında kültürün kaç günlük olduğu, besiyerinin tipi, kaç çeşit koloni olduğu, kolonilerin morfolojik özelliklerinin yanı sıra rengi ve kokusu, UV ışığı altında fluoresan verme özellikleri, pigment varlığı ve rengi, hemoliz varlığı, agarda çukurlaşma olup olmaması, besiyeri EYA ise lesitinaz ve lipaz zonları varlığı değerlendirilmelidir. Anaerop besiyerinde üreyen tüm izolatlar zorunlu anaerop olmayabilir. Zira fakültatif anaeroplardan ve hatta bazı zorunlu aeroplardan da anaerop koşullarda besiyerlerinde üreyebilmektedir. Bu nedenle üreme varlığında aerotolerans testi yapılmalıdır. Üreyen koloniler stereomikroskopta incelenerek iki pasaj yapılır, plaklardan biri aerop diğeri anaerop besiyerine ekilir ve 24 saatlik

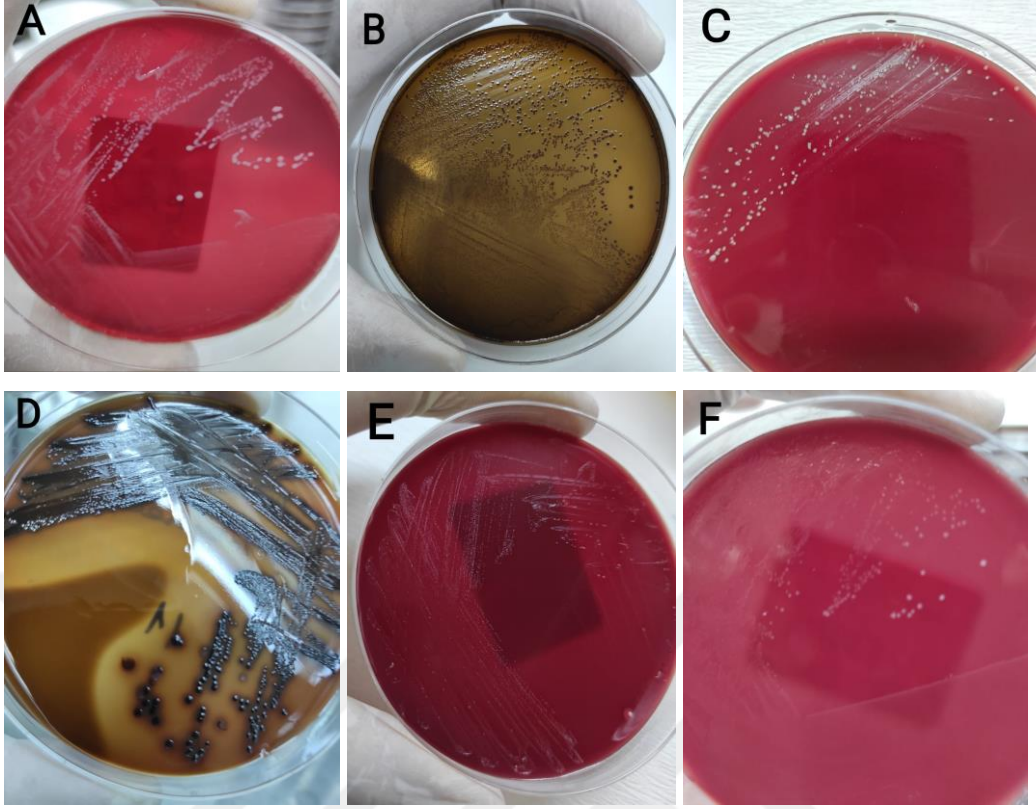
inkübasyon sonrasında plaklar incelenir. İzolatların aerop besiyerinde ürememesi zorunlu anaerop oldukları anlamına gelir (Ülger Toprak 2013).

Bazı anaerop bakteriler 365 nm dalga boyundaki UV ışığa maruz kaldıklarında farklı renklerde fluoresan ışımaya yayarlar. Gram boyama bulguları ve kolonilerin morfolojik özellikleriyle birlikte değerlendirildiğinde bu özellik çoğu için tanı koydurucudur (Procop et al. 2017). Tablo 5'te bu bakterilerin örnekleri görülmektedir.

Tablo 5. UV ışık altında fluoresan veren anaerop bakteriler (Bilgehan 2009, Garcia 2010, Procop et al. 2017, Shenoy et al. 2017)

Bakteri	Fluoresan
Pigmentli <i>Prevotella</i> türleri	Tuğla kırmızısı
<i>P. gingivalis</i> ve <i>P. bennonis</i> hariç tüm <i>Porphyromonas</i> türleri	Tuğla kırmızısı
<i>F. nucleatum</i> ve <i>F. necrophorum</i>	Sarımsı-Açık yeşil
<i>Veillonella</i> türleri	Kırmızı
<i>C. difficile</i>	Açık yeşil
<i>C. ramosum</i>	Kırmızı
<i>Eggerthella lenta</i>	Kırmızı

Bazı anaerop bakterilerin koloni özellikleri identifikasyon için çok önemli ipuçları vermektedir. *C. perfringens*'in yaptığı çift zonlu hemolizde olduğu gibi, bu özellikler gram boyama bulgularıyla birlikte değerlendirildiğinde başka test yapmaya gerek kalmayabilmektedir. Tablo 6'da çeşitli anaerop bakterilerin cins ya da tür düzeyinde tanı koydurabilen koloni özellikleri görülmektedir (Kıyan 1999, Bilgehan 2009, Gajdacs et al. 2017, Procop et al. 2017).



Resim 2. Çeşitli anaerop bakterilerin koloni morfolojileri (bu tez çalışmasından)

A. Düz, ıslak, gri koloniler (*B. fragilis*)

B. BSE agarda kahverengi koloniler (*B. fragilis*)

C. Ekmek kırıntısı gibi, kenarları düzensiz koloniler (*F. nucleatum*)

D. Siyah pigmentli koloniler (*P. nigrescens*)

E. Çok küçük, beyaz, düzensiz koloniler (*P. micra*)

F. Gri renkli, küçük, mat koloniler (*F. magna*)

Tablo 6. Bazı anaerop bakterilerin karakteristik koloni özellikleri (Finegold 2000, Garcia 2010, Procop et al. 2017)

Koloni Özelliği	Muhtemel Anaerop Bakteri
Yağda yumurta görünümünde koloni	<i>Fusobacterium mortiferum</i> , <i>F. varium</i>
Kumlu/ekmek kırıntısı görünümünde koloni	<i>F. nucleatum</i> , <i>Actinomyces dentalis</i> , <i>Actinomyces oricola</i>
Kanlı agarda yeşil renk oluşumu	<i>F. nucleatum</i> , <i>C. clostridioforme</i> (hava maruziyetinde)
Kanlı agarda kahverengi renk değişikliği	<i>C. ramosum</i>
BSE agarda balık gözü görünümünde koloni	<i>B. wadsworthia</i>
Kahverengi-siyah pigmentli koloni	<i>Porphyromonas</i> spp., <i>Prevotella</i> spp.
Agarda çukurlaşma	<i>Bacteroides ureolyticus</i> , <i>Sutterella wadsworthensis</i> , <i>Actinomyces dentalis</i>
Molar diş (azı dişi) görünümünde koloni	<i>A. israelii</i> , <i>P. propionicum</i>
Örümcek ağına benzeyen koloni	<i>A. israelii</i> , <i>P. propionicum</i>
Tereyağımsı koloni	<i>Actinomyces turicensis</i> , <i>Veillonella</i> spp.
Medusa başı benzeri üreme	<i>C. septicum</i>
Agar boyunca yayılıp buğu şeklinde besiyerinin yüzeyini kaplayan koloniler	<i>C. tetani</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. sordellii</i>
Kanlı agarda koloni etrafında sarı-kahverengi hale	<i>P. micra</i>
Çift hemoliz zonu	<i>C. perfringens</i> , <i>C. novyi</i> tip A (nadiren)
At ahır kokusu	<i>C. difficile</i>
Küf kokusu	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>
Tatlımsı koku	<i>P. anaerobius</i>

2.8.4. Anaerop Bakterilerin Tanımlanması (İdentifikasyon)

2.8.4.1. Konvansiyonel Yöntemler

Anaerop bakteriler kültürde ürediğinde ve saf olarak izole edildiğinde gram boyama özellikleri (gram reaksiyonu, hücrelerin boyutu, kok ya da basil olması, spor varlığı, diğer morfolojik özellikleri) ve hemoliz reaksiyonuna ilaveten Tablo 5 ve 6'daki spesifik durumlar tespit edildiğinde, cins ya da tür düzeyinde tanımlama yapmak mümkün olmaktadır. Bununla birlikte tanıyı kesinleştirmek veya spesifik bir özelliği olmayan anaeroplara tanımlamak amacıyla başka testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlar arasında bazı özel antibiyotikler kullanılarak yapılan identifikasyon diskleri, hareket testi ve biyokimyasal testler bulunmaktadır. Bu testlerle bazı anaeroplara tür düzeyinde, bazıları ise ancak cins düzeyinde tanımlanabilmektedir. Nadiren de olsa bazı anaerop bakteriler bu testlerle tanımlanamayabilir (Garcia 2010, Ülger Toprak 2013, Procop et al. 2017).

Anaerop bakterilerin identifikasyonunda ilk basamak testlerden birisi bazı identifikasyon testleridir. Özellikle gram negatif anaeroplara konvansiyonel yöntemlerle tanısında ilk başvurulacak testlerdir. Besiyeri olarak kanlı genel üretim besiyerlerinden herhangi birisi tercih edilebilir. Bu amaçla kanamisin (1000 µg), vankomisin (5 µg) ve kolistin (10 µg) diskleri kullanılır. Yeterli sürede inkübasyon sonunda inceleme yapılırken ilk dikkat edilecek disk vankomisin diskidir. Siyah pigmentli bir koloninin UV ışık altında tuğla kırmızısı renkte floresan vermesine ilaveten gram negatif bir bakteri olmasına rağmen vankomisin diski etrafında üreme zonu oluşturmaması *Porphyromonas* lehine bir bulgudur. Tür tayini için biyokimyasal testlere ihtiyaç vardır. *Prevotella* türleri vankomisine dirençlidir. Pigment oluşturmayan ve hızlı üreyen gram negatif bir basil her üç antibiyotiğe de direnç göstermişse *B. fragilis* grubundan olduğu anlaşılır. Tür tayini için yine ileri biyokimyasal testlere ihtiyaç duyulmaktadır. *Fusobacterium* türleri bu üç antibiyotikten sadece vankomisine dirençlidir. Bu nedenle sadece vankomisine dirençli olan koloniden gram boyama yapıldığında tüm hücreler fusiform yapıda gözlenirse bu bakterinin *F. nucleatum* olduğu anlaşılır. Hücreler pleomorfik ise tür tayini için başka testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Görüldüğü gibi koloni morfolojisi ve

gram boyama ile birlikte değerlendirildiğinde, identifikasyon diskleri tanı için önemli bilgiler sağlamaktadır (Gürler 2005, Kononen et al. 2011, Procop et al. 2017).

Çeşitli anaerop bakterilerin identifikasyonda kullanılan bu antibiyotiklere duyarlılık paternleri Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Anaerop bakterilerin identifikasyon diskleri ile ön tanısı (Gürler 2005, Garcia 2010, Kononen et al. 2011, Procop et al. 2017)

Bakteri	Kanamisin	Vankomisin	Kolistin
<i>B. fragilis</i> grubu	R	R	R
<i>B. ureolyticus</i>	S	R	S
<i>Prevotella</i> spp.	V	R	V
<i>Porphyromonas</i> spp.	R	S	R
<i>Fusobacterium</i> spp.	S	R	S
<i>B. wadsworthia</i>	S	R	S
<i>S. wadsworthensis</i>	S	R	S
<i>Veillonella</i> spp.	S	R	S
GPAK*	V	S	R

R: Resistant (dirençli), **S:** Sensitive (duyarlı), **V:** Variable (değişken)

*: Gram pozitif anaerop koklar

Anaerop bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle identifikasyonunda biyokimyasal testlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Bu testler arasında spot indol testi, katalaz testi, çeşitli karbonhidrat fermentasyon reaksiyonları, safraya duyarlılık, eskülin hidrolizi, kimotripsin oluşumu, EYA’da lesitinaz ve lipaz reaksiyonları, jelatin hidrolizi, propiyonat oluşumu, üreaz testi, hareket testi, nitrat redüksiyon testi bulunmaktadır.

Bu testler sonucunda genellikle cins düzeyinde identifikasyon başarıyla sağlanmakta, ancak bazı türlerin tayini için ileri ticari sistemler veya moleküler çalışmalar yapmak gerekebilmektedir (Gürler 2005, Ülger Toprak 2013, Procop et al. 2017)

Tablo 8 ve Tablo 9’da çeşitli anaerop bakterilerin identifikasyonu için kullanılan biyokimyasal test reaksiyonlarına örnekler verilmiştir.

Tablo 8. Bazı gram pozitif basillerin identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler (Gürler 2005, Garcia 2010, Kononen et al. 2011, Procop et al. 2017)

Dallanan, ince basiller (<i>Actinomyces</i> cinsi)				
Tür	Katalaz	Üreaz	Nitrat redüksiyonu	Eskülin hidrolizi
<i>A. israelii</i>	-	-	+	+
<i>A. johnsonii</i>	V	V	+	-
<i>A. turicensis</i>	-	-	-	-
Dallanmayan, kalın, sporlu basiller (<i>Clostridium</i> cinsi)				
Tür	Lesitinaz aktivitesi	Jelatin hidrolizi	Nitrat redüksiyonu	Eskülin hidrolizi
<i>C. perfringens</i>	+	+	+	-
<i>C. histolyticum</i>	-	+	-	-
<i>C. septicum</i>	-	+	V	+
<i>C. ramosum</i>	-	-	-	+

+: Pozitif, -: Negatif, V: Variable (değişken)

Tablo 9. Bazı gram negatif basillerin identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler (Garcia 2010, Procop et al. 2017)

<i>B. fragilis</i> grubu				
Tür	Safraya direnç (BSE agarda üreme)	Eskülin hidrolizi	İndol	Katalaz
<i>B. fragilis</i>	+	+	-	+
<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	+	+	+
<i>B. ovatus</i>	+	+	+	+
<i>B. vulgatus</i>	+	-	-	-
<i>Prevotella</i> cinsi				
Tür	Lipaz	Eskülin hidrolizi	İndol	Jelatin hidrolizi
<i>P. intermedia</i>	+	-	+	+
<i>P. melaninogenica</i>	-	V	-	+
<i>P. nigrescens</i>	+	-	+	+
<i>P. bivia</i>	-	-	-	+
<i>Fusobacterium</i> cinsi				
Tür	Lipaz	Safraya direnç (BSE agarda üreme)	Propiyonat oluşumu	İndol
<i>F. nucleatum</i>	-	-	-	+
<i>F. necrophorum</i>	V	-	+	+

+: Pozitif, -: Negatif, V: Variable (değişken)

Gram pozitif anaerop kokların identifikasyonunda ilk yapılacak test sodyum polianetol sulfonat (SPS) diskiyle yapılan duyarlılık testidir. *P. anaerobius* ve bazı *P. micra* suşları SDS'ye duyarlıdır. Diğerlerinin identifikasyonu için başka biyokimyasal testlere ihtiyaç duyulmaktadır (Hall and Byrd 2016, Procop et al. 2017).

2.8.4.2. Hızlı Enzimatik İdentifikasyon Sistemleri

Anaerop bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle identifikasyonunun uzun sürmesi, zor ve zahmetli olması araştırmacıları daha pratik biyokimyasal yöntemler bulmaya yöneltmiştir. Bu amaçla pratik, maliyet etkin ve daha kısa süren hızlı enzimatik sistemler geliştirilmiştir (Mory et al. 2009). API ZYM, Rapid ID 32A, Vitek 2 ANC Card (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), BBL Crystal Anaerobe ID System (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD, ABD), MicroScan Specialty Rapid Anaerobe Panel (Siemens Diagnostics, West Sacramento, CA, ABD), Remel RapID ANA II (Oxoid-Thermo Fisher, Cambridge, İngiltere) bu testler için geliştirilmiş ürünlerdir. Bu sistemler bakteriyel üremeyi takiben belli biyokimyasal ve enzimatik özellikleri 4-6 saatlik inkübasyon süresince test etiketinden sonra sayısal kodlar üretmektedir. Bu kodlar bilgisayar veri tabanı veya identifikasyon tablolarında işlenerek, konvansiyonel yöntemlerden daha kısa sürede anaerop bakterilerin tanımlanması gerçekleştirilmektedir. Ancak doğru tanımlama yapabilmek için çoğunlukla bu testlerin gram boyama, aerotolerans testi, koloni özellikleri ve sistemde bulunmayan biyokimyasal testlerle desteklenmesi gerekmektedir (Rodríguez-Cavallini et al. 2011, Procop et al. 2017).

2.8.4.3. Moleküler Yöntemler

Tüm bakterilerde mevcut olması, yüksek oranda korunmuş bir bölgede bulunması ve yapısında türe özgü değişken bölgeler içermesi nedeniyle 16S rRNA genom sekans analizi diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi anaerop bakterilerin identifikasyonu için de referans yöntemdir. Multipleks PCR ve gerçek zamanlı PCR gibi PCR temelli moleküler yöntemler de bu amaçla kullanılmaktadır. Konvansiyonel yöntemlerle identifikasyonun uzun zaman alması, birçok anaerop bakterinin tanımlanmasında güçlükler yaşanması ve taksonomide sıkça değişiklikler olması nedeniyle moleküler yöntemlere başvurmak zorunda kalınmaktadır. Ancak pahalı

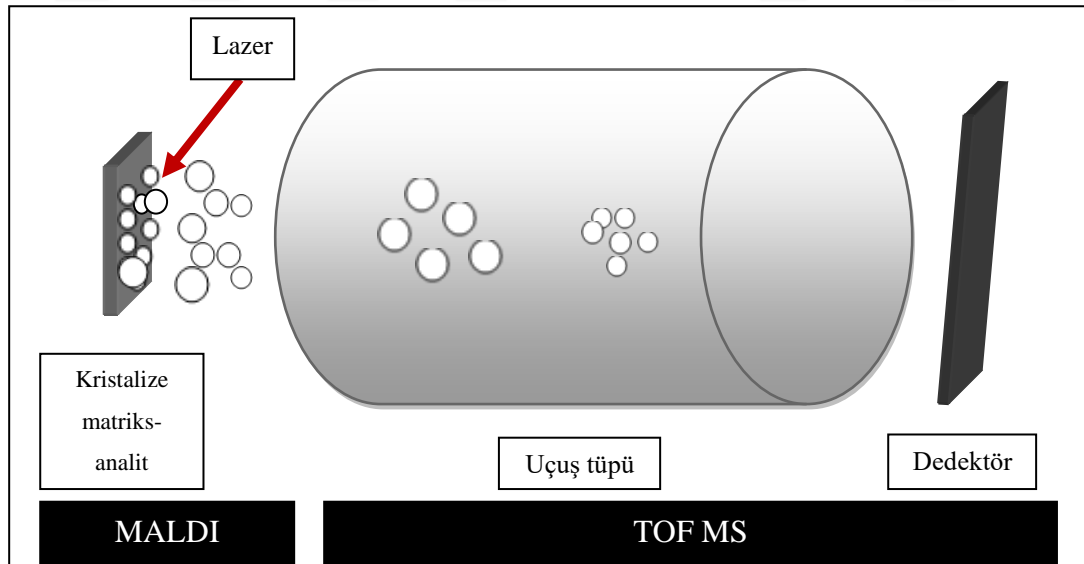
olması ve bu konuda deneyimli personel gerektirmesi rutin laboratuvarlarda çalışılmasını kısıtlamaktadır (Bizzini et. al 2011, Coltella et al. 2013, Větrovský and Baldrian 2013).

2.8.4.4. MALDI-TOF MS

Kütle spektrometrisi, maddelerin kütle/yük (m/z) oranını ölçen analitik bir tekniktir. Yaklaşık 150 yıldır bu alanda çalışmalar yapılmış ve çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu teknik, 1950’li yıllardan itibaren mikroorganizmalarla çalışan bilim insanlarının da dikkatini çekmiş ve kütle spektrometrisi yöntemiyle bakterilerin identifikasyonu sağlanmaya çalışılmıştır. İlk kez Anhalt ve Fenselau tarafından kütle spektrometrisi kullanılarak bakterilerin tanımlanması başarılmıştır (Anhalt and Fenselau 1975). Karas ve ark. (1987), matriks ve UV ışınını kullanarak alanin aminoasitini iyonize etmeyi başarmışlar ve bilim dünyasına “matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon (MALDI)” kavramını kazandırmışlardır. Daha sonra Tanaka ve ark. daha yüksek ağırlıklı bir proteini iyonize etmeyi başarmışlar ve bu buluş onlara Nobel ödülünü kazandırmıştır. Cain ve ark. (1994), kütle spektrometri yöntemi olarak uçuş zamanını kullanmışlar ve bu çalışma MALDI-TOF MS ile bakterilerin ilk kez tanımlanmasını sağlamıştır. Günümüzde FDA onaylı MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Billerica, MA, ABD) ve Vitek MS (bioMérieux, Durham, NC, ABD) iki ticari yöntem mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından kullanılmaktadır (Procop et al. 2017, Hou et al. 2019).

MALDI-TOF MS yönteminde, incelenecek olan bakterinin (analit) besiyerinde üremiş kolonilerinden az miktar alınıp bir metal plak (slayt) üzerinde matriksle karıştırılır. Matriks saf su ve organik solvent içeren bir bileşimdir. En sık kullanılan α -cyano-4-hidroksisinnamik asittir (CHCA). Solventler (asetonitril, etanol, aseton, metanol, kloroform gibi) bakterinin hücre membranını parçalayıp protein moleküllerinin (çoğunlukla ribozomal proteinler) birbirlerinden ayrılmasını sağladıktan sonra buharlaşarak ortamı terk eder. Matriks-analit karışımı kuruyunca kristalize olur. Daha sonra plaktaki bu karışımın üzerine lazer atışı (belli bir dalga boyunda UV ışını) uygulanır. Matriks, lazerin enerjisini absorbe ederek ısı enerjisine çevirir. Oluşan ısı analitteki moleküllerin proton (H^+) kazanarak veya kaybederek

iyonize olmasına ve bu yüklü iyonların m/z oranına göre bir elektrik alanda hareket etmesine neden olur. Bu hareket cihazda bulunan elektrotlar tarafından hızlandırılır. İyonlar uçuş tüpünde hareket ederken, bir reflektör (iyon aynası) vasıtasıyla en arkada bulunan detektöre yansıtılır. Küçük iyonlar daha hızlı hareket ederek büyük iyonlara göre detektöre daha erken ulaşır. Şekil 1’de MALDI-TOF MS’in çalışma prensibi basitçe şematize edilmiştir. Dedektör, iyonların uçuş süresini hesaplayarak (uçuş zamanı kütle spektrometrisi, TOF MS) analite ait bir kütle spektrumu oluşturur. Elde edilen spektrumlar her bakteri türüne özgü olduğundan bu spektrumlara protein kütle parmak izi de denmektedir. Bu spektrumlar daha sonra cihazın veritabanında bulunan mikroorganizmalara ait tüm spektrumlarla karşılaştırılarak identifikasyon gerçekleştirilir. Tüm bu işlemlerin incelenecek her bir bakteri için birkaç dakika sürmesi ve uygulanmasının basit olması göz önüne alınacak olursa; konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında, MALDI-TOF MS’in anaerop bakterilerin identifikasyonunu oldukça hızlandırdığı görülmektedir. Ayrıca cihaz bir kez satın alınınca, bundan sonraki çalışmaların maliyetinin düşük olması da bu yöntemin bir diğer avantajıdır (Elssner et al. 2011, Clark et al. 2013, Singhal et al. 2015).



Şekil 1. MALDI-TOF MS’in çalışma prensibi (Hou et al. 2019)

2.9. ANAEROP ENFEKSİYONLARIN TEDAVİSİ

Anaerop bakterilerin izolasyon ve identifikasyon işlemlerinin zahmetli olması ve uzun sürmesi, enfeksiyonların genellikle polimikrobiyal olması ve giderek artan düzeyde antibiyotiklere direnç gelişmesi gibi nedenlerle tedavileri zordur. Uygun antimikrobialerin seçilmesi ve çoğunlukla beraberinde apse drenajı, nekrotik dokunun debridmanı ve diğer cerrahi yöntemler uygulanması gerekmektedir. Ancak anaerop izolatların tümüne rutin olarak ADT yapılması son derece zaman alıcıdır ve maliyet etkin değildir. Bununla birlikte steril vücut bölgelerinden izole edilen, monobakteriyel olarak izole edilen, bakteriyemi ve beyin apsesi gibi yaşamı tehdit eden enfeksiyonlardan izole edilen, ampirik tedaviye yanıt vermeyen enfeksiyonlardan izole edilen anaerop bakterilere ADT yapılması tavsiye edilmektedir (Brook et al. 2013, Pence 2019).

Anaerop etkinliği bulunan antibiyotikler arasında metronidazol, β -laktam/ β -laktamaz inhibitör kombinasyonları (özellikle piperasilin-tazobaktam), karbapenemler, klindamisin, tetrasiklin, sefoksitin, kloramfenikol, moksifloksasin ve tigesiklin sayılabilir. Ancak *B. fragilis* grubu üyeleri başta olmak üzere birçok anaerop bakteride son yıllarda bu antibiyotiklere karşı direncin arttığı raporlanmaktadır. Örneğin *B. fragilis* grubu, pigmentli *Porphyromonas* ve *Prevotella*, *Fusobacterium* ve *Clostridium* türlerinin birçoğu beta-laktamaz üreterek penisiline ve sefalosporinlere direnç kazanmışlardır. Gram pozitif anaerop bakterilerden *Lactobacillus* türleri, *Cutibacterium acnes* ve *Actinomyces* türleri metronidazole doğal dirençlidir. Az sayıda *B. fragilis* grubu üyesi de *nim* genindeki mutasyonlar nedeniyle metronidazole direnç geliştirmiştir. Bunların dışında anaeroplara karşı mükemmel sayılabilecek *in vitro* etkinliğe sahip olan metronidazol anaerop enfeksiyonların genellikle polimikrobiyal olması ve bu ilacın aerop ve fakültatif anaeroplara etkisiz kalması nedeniyle monoterapide başarısız kalmaktadır. Klindamisin, klinik çalışmalarda etkinliği kanıtlanmış, anaeroplara karşı geniş bir aktivite yelpazesine sahip antibiyotiktir. Özellikle penisiline alerjisi olan hastalarda kullanılmıştır. BOS hariç vücut dokularına ve sıvılarına hızla nüfuz eder. Ancak *C. difficile* ile ilişkili kolit yan etkisi ve *B. fragilis* grubundaki *erm* gen ekspresyonu sonucunda artan direnç nedeniyle kullanımı sınırlanmıştır. Karbapenemlere karşı direnç ise anaeroplarda oldukça nadirdir. Ayrıca tüm anaeroplara ilaçların etki

mekanizmaları nedeniyle aminoglikozitlere, trimetoprim-sülfametoksazole ve aztreonama dirençlidir. (Brook et al. 2013, Pence 2019).

CLSI ve EUCAST diğer bakterilerde olduğu gibi anaeroplara için de belli standartlar ve antibiyotik MİK değerleri yayınlamıştır. CLSI referans yöntem olarak %5 hemolize koyun kanı, 5 µg/ml hemin ve 1 µg/ml vitamin K₁ ilavesiyle zenginleştirilmiş brusella agar kullanılarak yapılan agar dilüsyon yöntemini ve sadece *B. fragilis* grubu için aynı eklemelerle brusella broth kullanılarak yapılan broth sıvı mikrodilüsyon (BMD) yöntemini önermektedir. EUCAST ise anaeroplara için özel bir test önermemekle birlikte antibiyotikler için MİK değeri hesaplanmasını tavsiye etmektedir. Bu amaçla laboratuvarlarda çoğunlukla gradyan difüzyon yöntemi olan Etest kullanılmaktadır. Disk difüzyon yöntemi ise sonuçları agar dilüsyon ile korele olmadığından dolayı anaerop bakterilerin antibiyotik duyarlılığını belirlemede önerilmemektedir (CLSI 2018, Pence 2019).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. ETİK KURUL ONAYI

Çalışmamızın etik kurul onayı; Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan, 26.02.2019 tarihli imza ile alınmıştır (Ek 1).

3.2. SUŞLARIN SEÇİMİ

Laboratuvarımız kültür koleksiyonunda bulunan standart bakteri suşlarından *Bacteroides fragilis* ATCC 25285TM, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586TM suşları ile yara, periton mayisi, plevral mayi, kan ve diğer steril vücut sıvıları gibi klinik örneklerden izole edilen anaerop bakteri suşları çalışmaya dahil edilmiştir. 16 adet *Prevotella* spp. (üç adet *P. bivia*, iki adet *P. buccae*, bir adet *P. denticola*, iki adet *P. intermedia*, bir adet *P. loeschii*, iki adet *P. melaninogenica*, iki adet *P. nigrescens*, üç adet *P. veroralis*), 14 adet *Bacteroides* spp. (sekiz adet *B. fragilis*, dört adet *B. thetaiotaomicron*, iki adet *B. ovatus*), 2 adet *Porphyromonas asaccharolytica*, 3 adet *Fusobacterium* spp. (iki adet *F. nucleatum*, bir adet *F. varium*), 3 adet *Veillonella dispar*, 6 adet *Finegoldia magna*, 3 adet *Peptostreptococcus anaerobius*, 4 adet *Peptoniphilus asaccharolyticus*, 3 adet *Anaerococcus vaginalis*, 2 adet *Parvimonas micra*, 3 adet *Actinomyces* spp. (iki adet *A. turicensis*, bir adet *A. europaeus*), 2 adet *Cutibacterium acnes*, 4 adet *Clostridium* spp. (iki adet *C. ramosum*, birer adet *C. perfringens* ve *C. clostridioforme*), 1 adet *Atopobium rimae* ve 1 adet *Eggerthia catenaformis* olmak üzere toplamda 67 klinik izolat incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilmesi planlanan suşlardan *Dialister micraerophilus* suşu pasaj aşamasında üretilemediğinden çalışma dışında kalmıştır. Klinik izolatlar VITEK MS (bioMérieux, Durham, NC) ile tanımlanmıştır.

3.3. KULLANILAN BESİYERLERİ, KİTLER VE CİHAZLAR

3.3.1. Anaerobik Agar ve Schaedler Agar

Anaerop bakterileri izole edebilmek amacıyla temel besiyeri olarak anaerobik agar (Condalab, Madrid, İspanya) ve Schaedler agar (Oxoid, Basingstoke, İngiltere) kullanıldı. Üremeyi artırmak için %5 koyun kanı, 1 µg/ml hemin ve 1 µg/ml vitamin K₁ ilave edildi.

Anaerobik agar içeriği (g/L):	Kazein pepton	17,5
	Dekstroz	10
	Soy pepton	2,5
	Sodyum klorid	2,5
	Sodyum tiyoglikolat	2
	Sodyum formaldehit sülfoksilat	1
	L-sistein	0,4
	Metilen mavisi	0,002
	Bakteriyolojik agar	15
Schaedler agar içeriği (g/L):	Tripton soy broth	10
	Pepton	5
	Maya özütü	5
	Glukoz	5
	Sistein HCl	0,4
	Hemin	0,01
	Tris tamponu	0,75
	Agar	13,5

Hazırlanışı: Öncelikle hemin ve vitamin K₁ stok solüsyonları hazırlandı. 20 ml %95'lik etanol içinde 0,2 g vitamin K₁ çözülerek (10 mg/ml) steril, koyu renkli, kapaklı bir şişede buzdolabında saklandı. 0,5 g hemin 1N 1 ml NaOH içinde çözüldü ve distile su ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Bu da steril, koyu renkli, kapaklı bir şişede buzdolabında saklandı. Anaerobik agar tozu 51 g ve Schaedler agar tozu 40 g tartılarak 1000'er ml distile suda eritildikten sonra 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. 50 °C'ye soğutulduktan sonra aseptik koşullarda her ikisine de %5 koyun kanı, 1 ml hemin ve 1 ml vitamin K₁ solüsyonu ilave edildi. Daha sonra her bir plağa 20'şer ml olacak şekilde dağıtıldı ve buzdolabında saklandı.

3.3.2. *Bacteroides* Safra Eskülin Agar (BSE)

B. fragilis grubu bakterileri seçici olarak üretmek için *Bacteroides* safra eskülin agar (Condalab, Madrid, İspanya) kullanıldı.

İçeriği: Triptikazein soy agar	40 g/L
Sığır safrası	20 g/L
Eskülin	1 g/L
Ferrik amonyum sitrat	0,5 g/L
Gentamisin sülfat	100 mg/L
Hemin	10 mg g/L

Hazırlanışı: BSE agar tozu 40 g tartılarak 1000'er ml distile suda eritildikten sonra 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. 50 °C'ye soğutulduktan sonra aseptik koşullarda her bir plağa 20'şer ml olacak şekilde dağıtıldı ve buzdolabında saklandı.

3.3.3. Brusella Agar

İdentifikasyon diskleriyle tanımlama yapmak amacıyla brusella agar (BBL, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, ABD) kullanıldı.

İçeriği: Kazein	10 g/L
Pepton	10 g/L
Dekstroz	1 g/L
Maya özütü	2 g/L
Sodyum klorid	5 g/L
Sodyum bisülfid	0,1 g/L
Agar	15 g/L

Hazırlanışı: Brusella agar tozu 43 g tartılarak 1000 ml distile suda eritildikten sonra 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. 50 °C'ye soğutulduktan sonra aseptik koşullarda %5 koyun kanı, 1 ml hemin ve 1 ml vitamin K₁ solüsyonu ilave edildi. Daha sonra her bir plağa 20'şer ml olacak şekilde dağıtıldı ve buzdolabında saklandı.

3.3.4. Skim Milk Besiyeri

Klinik örneklerden izole edilen anaerop bakteri suşlarının stok kültürü amacıyla skim milk besiyeri hazırlandı. 100 g toz halindeki skim milk (yağı alınmış süt tozu) 1000 ml distile su içinde çözüldü. Solüsyonun karamelize olmaması için otoklav süresi kısa tutulmuş olup, 121 °C’de 1 atm basınç altında 5 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra steril vida kapaklı tüplere 1'er ml dağıtıldı ve buzdolabında saklandı. Örneklerden izole edilen anaerop bakteriler bu besiyerlerinde -80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.3.5. Otomatize Sistem Tanı Kiti

MALDI-TOF MS ve konvansiyonel yöntemlerle performansını karşılaştırmak amacıyla Vitek 2 sistemi kullanılarak Vitek 2 ANC Card (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile identifikasyon yapıldı.



Resim 3. Bu tez çalışmasında kullanılan Vitek 2 sistemi cihazı

3.3.6. MALDI-TOF MS

Çalışmaya aldığımız ve daha önce MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlanan suşlar anaerobik kanlı agar ve Schaedler kanlı agarda yeniden üretildikten sonra üremiş koloniden ve kan kültür şişesinden direkt olarak identifiye etmek amacıyla Vitek MS (bioMérieux, Durham, NC) kullanıldı. Matriks olarak ise üretici firmanın önerileri doğrultusunda CHCA kullanıldı.



Resim 4. Bu tez çalışmasında kullanılan MALDI-TOF MS cihazı

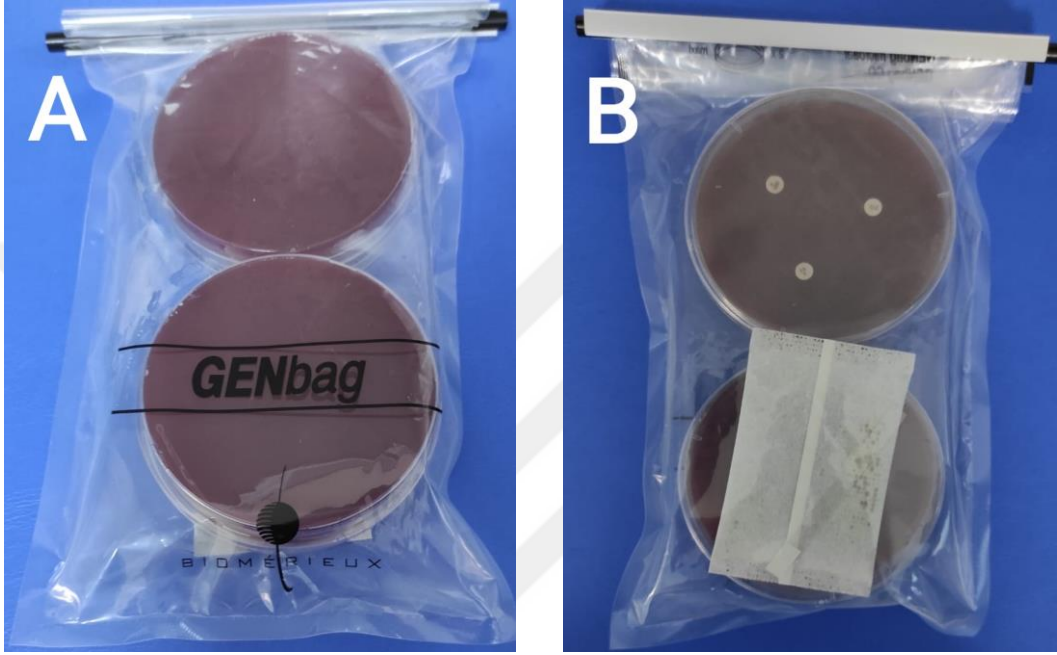
3.3.7. Biyokimyasal Testler

Konvansiyonel yöntemler ile anaerop bakterileri tanımlamak için gram boya seti, identifikasyon diskleri, spot indol, katalaz, üreaz gibi biyokimyasal testler ile BSE agar kullanıldı.

3.3.8. Anaerop Poşetler ve İndikatörler

Anaerop ortamı sağlamak amacıyla anaerop poşetler ve katalizörler (Genbag, bioMérieux, Shanghai, Çin) kullanıldı. Anaerop ortamın oluşup oluşmadığını kontrol

etmek amacıyla metilen mavisi emdirilmiş kâğıt stripler (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) dışardan gözlenebilecek şekilde poşetlerin içine yerleştirildi. Striplerin rengi maviden beyaza dönüşürse durumunda anaerop ortamın sağlandığı anlaşıldı. Stripte renk değişikliği oluşmamişsa işlemler tekrarlandı. 37°C’de en az 48 saat inkübe edildi. Anaerop inkübasyon ve kontrolü Resim 5’te gösterilmiştir.



Resim 5. Bu tez çalışmasında kullanılan anaerop poşet ve indikatör
A: Anaerop poşet sistemi,
B: Anaerop ortam sağlayıcı (katalizör) ve ortamın anaerop olduğunu gösteren metilen mavisi stribi (indikatör)

3.4. BAKTERİ SÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI

Tüm bakteri suşları anaerobik agar ve Schaedler agar plaklarına ekildi. 37°C’de en az 48 saat inkübe edildi. Diğerlerinden daha yavaş üreyen bazı suşlar için bu süre uzatıldı. Çalışmaya dahil edilen klinik izolatlardan 1 adet *Dialister micraerophilus* suşu inkübasyon süresi uzatılmasına rağmen üretilmediği için ileri testler yapılamadı. İdentifikasyon diskleri için ve kan kültürü şişesinden direkt identifikasyon işleminde kullanılmak üzere her bakteri için tek düşen kolonilerden spektrofotometrik yöntem kullanılarak (DensiCHEK plus, bioMérieux, Fransa) 0,5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlandı.

3.5. YÖNTEM

3.5.1. Örneklerin Toplanması ve İşleme Alınması

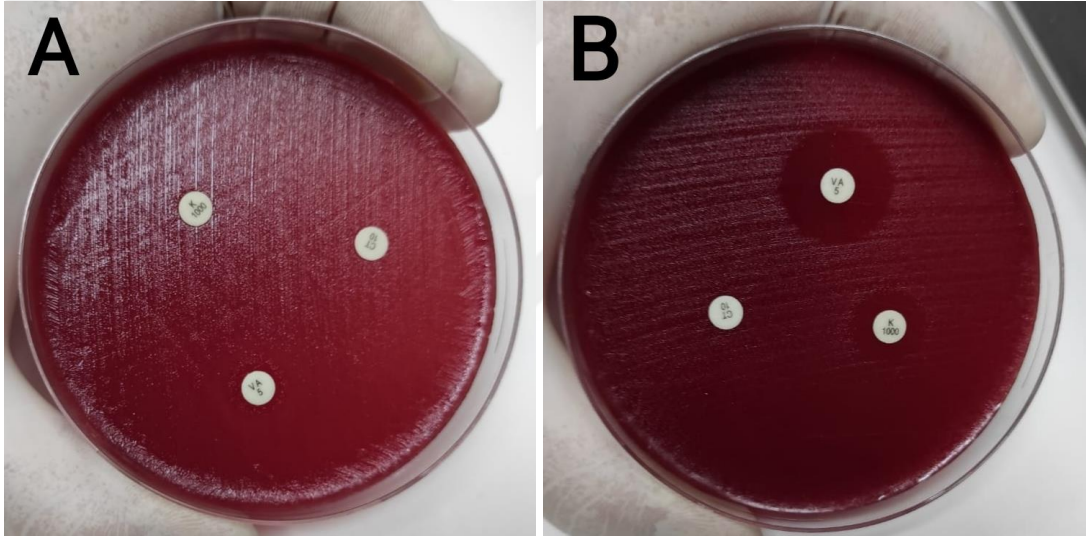
Çalışmamıza 01.01.2019-01.01.2020 tarihleri arasında hastanemizdeki poliklinik ve servislerden anaerop kültür istemiyle laboratuvarımıza gönderilen 1154 rutin klinik örnekten etken olarak izole edilen 68 klinik izolat dahil edildi. Bu örnekler laboratuvarımıza ulaştırıldıktan sonra, tüm işlemler SÜEAH Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirildi. Laboratuvara anaerop kültür istemiyle gelen örnekler vakit kaybedilmeden hemen işleme alındı. Gelen örneklerin anaerop kültür için uygun örnek olup olmadıkları değerlendirilerek steril, vida kapaklı plastik kaplarda ya da enjektörlerde laboratuvarımıza gönderilen örnekler işleme alındı. Uygun yöntemle alınmayan örnekler kliniklere haber verilerek anaerop kültür işlemine alınmadı. Klinik örnekler öncelikle pürülan, kanlı, kötü kokulu olması gibi makroskopik özellikleri açısından değerlendirildi. Tüm örnekler derhal anaerop kültür plaklarına ekilerek 37°C'de en az 48 saat inkübe edildi. Ekim sonrası örneklerden preparat hazırlanarak gram boyama yapıldı ve mikroskopta anaerop bakterilerin tipik morfolojik özellikleri, boyanma paternleri, örneklerin inflamatuvar hücreler içerip içermemeleri gibi bulgular yönünden incelenerek notlar alındı.

3.5.2. Kültür İşlemleri ve İdentifikasyon

Anaerop kültür için uygun olan klinik örneklerden anaerobic agar ve Schaedler kanlı agara ekimleri yapıldı. Uygun inkübasyon süresi sonunda üreyen kolonilerin morfolojik görünüşleri ve pigment oluşumu incelendi. Saf olarak üremiş koloniler, çalışmada kullanmak amacıyla pasaj alındıktan sonra MALDI-TOF MS ile identifiye edildi. Karışık üremenin olduğu plaklarda ise farklı görünümdeki tüm koloniler stereomikroskopta incelendi. Aerotolerans testi amacıyla anaerobik kanlı agar ve çikolata agara pasajları yapılarak anaerop ve aerop inkübasyon gerçekleştirildi. Bir gecelik inkübasyon sonunda aerop ortamda üremeyenler zorunlu anaerop bakteri olarak değerlendirilerek identifikasyon işlemine alındı.

Anaerop bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle identifikasyonu amacıyla identifikasyon diskleri ve spot indol, katalaz, üreaz gibi biyokimyasal testler uygulandı. İdentifikasyon diskleri olarak kanamisin (1000 µg), vankomisin (5 µg) ve kolistin (10 µg) diskleri (Antimikrobiyal Duyarlılık test diskleri, Bioanalyse, Ankara, Türkiye) kullanıldı. Bu amaçla kolonilerden 0,5 McFarland yoğunluğunda (~1X10⁸

CFU/ml) bakteri süspansiyonu hazırlanarak brusella agara ekimi yapıldı ve diskler yerleştirildikten sonra anaerob inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon sonrası zon çapları cetvelle ölçülerek değerlendirildi. Zon çapı 10 mm'den büyük olan diskler duyarlı (S), küçük olanlar ise dirençli (R) olarak değerlendirildi. Resim 6'da gram negatif anaerobların disk görüntülerine örnek verilmiştir. Ayrıca *B. fragilis* grubu üyelerinin identifikasyonu amacıyla şüpheli kolonilerden BSE agara pasaj yapılarak inkübasyon sonunda bakterilerin safraya direnç ve eskülin hidrolizi özellikleri incelendi. *B. fragilis* grubu üyelerinin besiyerinde bulunan safradan etkilenmeyip ürediği, eskülini hidrolize ederek kolonilerin etrafında kahverengisiyah renk oluşturduğu gözlemlendi.



Resim 6. Gram negatif basillerin identifikasyon diskleriyle tanımlanması (bu tez çalışmasından)

A: Vankomisin: dirençli, Kanamisin: dirençli, Kolistin: dirençli (*Bacteroides fragilis*)

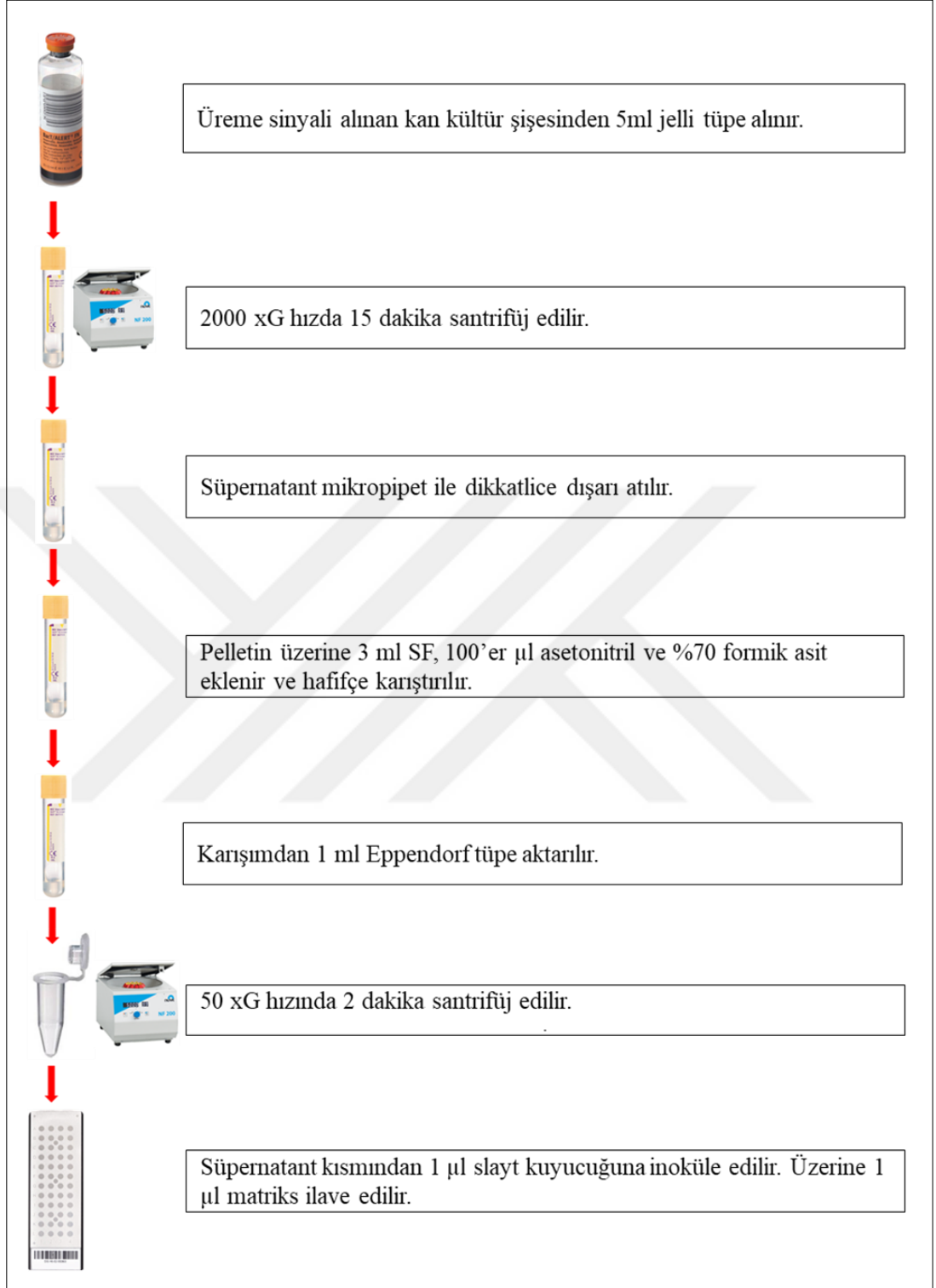
B: Vankomisin: duyarlı, Kanamisin: dirençli, Kolistin: dirençli (*Porphyromonas* spp.)

Anaerob bakterileri Vitek 2 sistemi ile identifiye etmek amacıyla tüm bakterilerden 3 McFarland yoğunluğunda süspansiyon hazırlandı. Vitek 2 ANC Card (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) kullanılarak cihaza yerleştirildi, gram boyama özellikleri cihaza kaydedildi ve bir gecelik inkübasyon sonunda sonuçlar değerlendirildi.

3.5.3. Kan Kültürü Şişesinden Direkt İdentifikasyon

Bir diğer yöntem olarak kan kültürü şişelerinden anaerop bakterilerin MALDI-TOF MS ile direkt identifikasyonu hedeflendi. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu uygulanacak prosedür belirlendi. Uygulanan prosedürde önce tüm bakterilerden 0,5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlandı. Tüpler vortekslendikten sonra her birinden steril polipropilen tüplere 10 µl aktarıldı. Tüm polipropilen tüplere 10 ml %0,9 serum fizyolojik (SF) ilave edildi. Bunlar da vortekslendikten sonra yine her birinden 0,5 ml alındı ve BacT/AlertALER-FN Plus (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) kan kültürü şişelerine ekim yapılarak spike/simüle örnekler hazırlandı. Daha sonra tüm kan kültürü şişelerine 10 ml kan eklenerek BacT/ALERT® 3D Microbial Detection System (3D, bioMérieux Inc., Durham, NC, ABD) cihazında inkübe edildi. Cihaz üreme sinyali verdiğinde şişeler cihazdan çıkarılarak anaerop besiyerlerine pasajlandı ve inkübasyona bırakıldı. Uygun süre inkübasyonun ardından plakların kültür değerlendirilmesi yapılarak MALDI-TOF MS ile tüm bakteriler kontrol amacıyla tekrar identifiye edildi. Bu amaçla bakteri kolonilerinden az miktar steril özelerle alınıp üretici firmanın sağladığı 48 kuyucuklu slaytlara inoküle edildi. Üzerlerine 1 µl matriks solüsyonu ilave edildi. Bu karışım kuruduktan sonra slaytlar cihaza yüklenerek identifikasyon sonuçları değerlendirildi.

Direkt identifikasyon işlemi için ise pozitif sinyal veren tüm kan kültürü şişelerinden steril enjektörler vasıtasıyla 5 ml kan 16x100'lük 8,5 ml BD Vacutainer plastik SST jelli tüplere alındı. Tüpler 2000 xG hızında 15 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant mikropipet kullanılarak dışarıya atıldı. Kalan pelletin üzerine 3 ml SF ile 100'er µl asetonitril ve %70'lik formik asit ilave edildikten sonra tüpler hafifçe elle karıştırıldı. Bu karışımdan 1 ml alınarak steril 1,5 ml'lik Eppendorf tüplerine aktarıldıktan sonra 50 xG hızında 2 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj sonrası supernatant kısmından 1 µl alınarak MALDI-TOF MS slaytında bulunan kuyucuklara inoküle edildi. Kurumaları beklendikten sonra üzerlerine 1 µl matriks ilave edildi. Bu karışım da kuruduktan sonra slaytlar cihaza yüklenerek identifikasyon sonuçları değerlendirildi.



Resim 7. Kan kültürü şişesinden MALDI-TOF MS ile direkt identifikasyon prosedürü

4. BULGULAR

Anaerop enfeksiyon şüphesiyle laboratuvarımıza gelen 1154 klinik örnekten 688'i (%59,6) yara örneği (apse, aspirasyon ve doku biyopsi materyali), 115'i (%10) periton mayisi, 78'i (%6,7) kan, 66'sı (%5,7) plevral mayi, 54'ü (%4,6) BOS, 42'si (%3,6) eklem sıvısı, 111'i (%9,6) ise diğer steril vücut sıvısı örneği idi (Tablo 10).

Anaerop kültür yapılan 1154 örnekten üreme saptananların 19'unda (%1,6) sadece zorunlu anaerop bakteriler, 438'inde (%37,9) fakültatif anaerop ya da zorunlu aerop bakteriler üredi; 38'inde (%3,2) ise zorunlu anaeroplardan da olduğu karışık üreme saptandı. Örneklerin 659'unda (%57,1) üreme olmadı (Tablo 10).

Üreme saptanan örneklerden toplam 706 bakteri izole edilmiş olup bunların 68'i (%9,6) zorunlu anaerop, 638'i (%90,3) fakültatif anaerop ya da aerop idi. Toplam 688 yara örneğinden 13'ünde (%1,8) zorunlu anaerop, 34'ünde (%4,9) zorunlu anaeroplardan da olduğu karışık üreme saptandı. Anaerop kan kültürü şişesi ile gelen 78 kan örneğinin 2'sinde (%2,5) zorunlu anaerop, 21'inde (%26,9) fakültatif anaerop bakteriler üredi. Anaerop kültür istemiyle gelen 388 steril vücut sıvısı örneğinden 5'inde (%1,2) zorunlu anaerop, 2'sinde (%0,5) zorunlu anaeroplardan da olduğu karışık üreme saptandı. Anaerop ve aerop bakterilerin örnek türlerine göre dağılımı Tablo 10'da verilmiştir.

Anaerop kültür işlemine alınan toplam 1154 kültürün 57'sinde (%4,9) zorunlu anaerop bakteriler üredi. Anaerop üreme saptanan 57 örnekten 68 adet zorunlu anaerop bakteri izole edildi. Anaerop üreme saptanan örnek başına 1,2 adet anaerop bakteri üremesi oldu.

Tablo 10. Anaerop kültür işlemine alınan örnek türleri ve üreyen bakteri sayıları

ÖRNEK TÜRÜ	ÜREME OLAN/OLMAYAN KÜLTÜR SAYISI					ÜREME SAYISI	
	SADECE ZORUNLU ANAEROP	AEROP/AKÜLTATİF/ZORUNLU ANAEROP	SADECE AEROP/FAKÜLTATİF ANAEROP	ÜREME OLMAYAN	TOPLAM	ZORUNLU ANAEROP	AEROP/FAKÜLTATİF ANAEROP
YARA (APSE+DOKU)	13	34	226	415	688	57	385
PERİTON MAYISI	1	2	52	60	115	3	84
STERİL (DİĞER)	3	1	69	38	111	5	74
KAN	1	1	22	54	78	2	23
PLEVRAL MAYI	1	0	31	34	66	1	32
BOS	0	0	20	34	54	0	20
EKLEM SIVISI	0	0	18	24	42	0	20
TOPLAM	19	38	438	659	1154	68	638

Laboratuvarımıza gelen klinik örneklerden izole edilen 68 anaerop bakteriden 39'u (%57,3) gram negatif idi. Bunların içinde de büyük çoğunluğu (%76,9) *Prevotella* spp. ve *B. fragilis* grubu üyeleri oluşturdu. Tablo 11'de klinik örneklerde üreyen gram negatif anaeroplara dağılımı verilmiştir.

Tablo 11. Üreyen gram negatif anaerob bakterilerin örnek türüne göre dağılımı

Bakteri adı	Yara	Steril (diğer)	Periton mayisi	Kan	Plevral mayi	TOPLAM
<i>Prevotella</i>	<i>P. bivia</i>	3	0	0	0	3
	<i>P. veroralis</i>	2	1	0	0	3
	<i>P. melaninogenica</i>	1	0	0	1	2
	<i>P. nigrescens</i>	1	1	0	0	2
	<i>P. buccae</i>	2	0	0	0	2
	<i>P. intermedia</i>	2	0	0	0	2
	<i>P. loeschii</i>	1	0	0	0	1
	<i>P. denticola</i>	1	0	0	0	1
<i>B. fragilis</i> grubu	<i>B. fragilis</i>	7	0	0	1	8
	<i>B. thetaiotaomicron</i>	3	0	1	0	4
	<i>B. ovatus</i>	2	0	0	0	2
Diğer gram negatifler	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1	0	0	0	1
	<i>Fusobacterium varium</i>	1	0	0	0	1
	<i>Porphyromonas asaccharolyticus</i>	2	0	0	0	2
	<i>Dialister micraerophilus</i>	1	0	0	0	1
	<i>Veillonella dispar</i>	2	0	1	0	3
TOPLAM	32	2	2	2	1	39

Laboratuvarımıza gelen klinik örneklerden izole edilen 68 anaerob bakteriden 29'u (%42,6) gram pozitif idi. En çok üreyen bakteri GPAK üyesi olan *Fingoldia magna* oldu. Tablo 12'de klinik örneklerde üreyen gram pozitif anaerobların örneklere göre dağılımı verilmiştir.

Tablo 12. Üreyen anaerop gram pozitif bakterilerin örnek türüne göre dağılımı

Anaerop bakteri adı		Yara	Steril (diğer)	Periton mayisi	Kan	Plevral mayi	TOPLAM
Gram pozitif koklar	<i>Finegoldia magna</i>	5	1	0	0	0	6
	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	4	0	0	0	0	4
	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	3	0	0	0	0	3
	<i>Anaerococcus vaginalis</i>	3	0	0	0	0	3
	<i>Parvimonas micra</i>	2	0	0	0	0	2
Gram pozitif basiller	<i>Clostridium ramosum</i>	2	0	0	0	0	2
	<i>Clostridium perfringens</i>	1	0	0	0	0	1
	<i>Clostridium clostridioforme</i>	1	0	0	0	0	1
	<i>Actinomyces turicensis</i>	1	1	0	0	0	2
	<i>Actinomyces europaeus</i>	1	0	0	0	0	1
	<i>Cutibacterium acnes</i>	1	1	0	0	0	2
	<i>Atopobium rimae</i>	0	0	1	0	0	1
	<i>Eggerthia catenaformis</i>	1	0	0	0	0	1
TOPLAM		25	3	1	0	0	29

Anaerop enfeksiyon şüphesiyle gönderilen örneklerde aerop ya da fakültatif anaerop olan 326 gram negatif, 300 gram pozitif ve 11 *Candida* spp. üredi. Gram pozitif bakterilerden en çok *Staphylococcus aureus* ürerken (%41), gram negatiflerden en çok *Escherichia coli* izole edildi (%38,6). Tablo 13 ve 14'te izole ettiğimiz aerop ya da fakültatif anaerop bakterilerle ilgili veriler görülmektedir.

Tablo 13. Anaerop bakteri izole edilen örneklerde üreyen aerop/fakültatif anaerop bakterilerin dağılımı

	Bakteri adı	Yara	Kan	Steril (diğer)	Periton mayisi	TOPLAM
Gram negatifler	<i>Escherichia coli</i>	6	5	0	0	11
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	1	0	0	4
	<i>Morganella morganii</i>	3	0	0	0	3
	<i>Enterobacterales</i> (diğer)	4	4	0	0	8
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	2	0	0	5
	Diğer aeroplara	5	1	0	0	6
Gram pozitifler	<i>Enterococcus faecalis</i>	5	1	0	0	6
	<i>Enterococcus faecium</i>	1	0	0	0	1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	3	0	0	4
	KNS*	0	2	0	0	2
	<i>Streptococcus constellatus</i>	3	0	0	0	3
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	0	0	0	2
	Diğer streptokoklar	7	1	1	1	10
TOPLAM		43	20	1	1	65

*: Koagülaz negatif stafilokoklar

Tablo 14. Tüm örneklerden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı

Bakteri adı		Yara	Periton mayisi	Steril (diğer)	Kan	Plevral mayi	BOS	Eklem sıvısı	TOPLAM
Gram negatifler	<i>E. coli</i>	78	26	8	5	5	2	2	126
	<i>Enterobacterales</i> (diğer)	84	23	16	4	5	1	1	134
	Aeroplalar	29	11	7	3	8	1	7	66
Gram pozitifler	<i>S. aureus</i>	99	2	12	3	2	1	4	123
	<i>Enterococcus</i> spp.	34	14	7	1	2	0	0	58
	<i>Streptococcus</i> spp.	30	5	8	1	7	5	1	57
	KNS*	24	4	15	2	2	10	5	62
Mantarlar	<i>Candida albicans</i>	5	0	1	1	1	0	0	8
	Non-albicans <i>Candida</i>	2	0	0	1	0	0	0	3
TOPLAM		385	85	74	21	32	20	20	637

*: Koagülaz negatif stafilokoklar

4.1. KONVANSİYONEL YÖNTEM BULGULARI

Anaerop bakterilerin identifikasyonu amacıyla konvansiyonel yöntem olarak öncelikle 67 klinik suş ve 2 standart suşun kolonilerinden hazırlanan preparatların gram boyaması yapılarak; bakterilerin morfolojik bulguları ile birlikte gram özellikleri, kok ya da basil olmaları ve varsa spor yapıları gibi bulgular yönünden mikroskopta incelendi.

Koloni özellikleri ve gram boyama bulgularına göre siyah pigmentli koloni oluşturup mikroskop incelemesinde gram negatif kokobasil ya da basil görünümündeki 7 adet suş ile pigment oluşturmayan ve mikroskop incelemesinde yine gram negatif kokobasil ya da basil olarak görünen 32 suş (toplamda 39 suş) ilk olarak identifikasyon diskleri ile analiz edildi. Gram negatif anaerop basil olan 39 suştan pigmentli koloni yapısına sahip olup vankomisine duyarlı, kanamisin ve kolistine

dirençli olan 2 suşun *Porphyromonas* türü olduğu anlaşıldı. Bu suşlara spot indol testi yapıldı. İndol testi pozitif olan bu suşların *P. asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* ya da *P. uenonis* olduğu düşünüldü ancak ileri identifikasyonu yapılamadı. Kalan 35 suşun tamamı BSE agara pasajlandıktan sonra, bu suşlara spot indol testi uygulandı. Pigmentli koloni yapısında olup mikroskopik incelemede gram negatif basil görünümündeki 5 suş her üç antibiyotiğe de dirençli bulundu ve *Prevotella* spp. olduğu anlaşıldı. Suşların hiçbiri BSE agarda üremedi. İndol pozitif olan 3 suşun *P. intermedia* ya da *P. nigrescens* olduğu; indol negatif olan 2 suşun ise başka bir pigmentli *Prevotella* spp. olduğu düşünüldü. Ancak daha ileri identifikasyonları yapılamadı. Besiyerinde pigment oluşturmayan gram negatif basillerden kanamisine duyarlı olup vankomisin ve kolistine dirençli olan 11 suşun hiçbiri BSE agarda üremedi ve indol testleri negatifti. Pigment oluşturmayan *Prevotella* spp. oldukları anlaşıldı ancak daha ileri identifikasyonları yapılamadı. Her üç antibiyotiğe de dirençli olan, BSE agarda çok iyi üreyen (safra dirençli), besiyerini kahverengi-siyah renge boyayan (eskülini hidrolize eden) 15 suşun *B. fragilis* grubu olduğu anlaşılacak indole ilaveten katalaz testleri de yapıldı. Her ikisi de pozitif olan 6 suşun *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* ya da *B. stercoris* olduğu düşünüldü ancak daha ileri identifikasyonu yapılamadı. İndol negatif ve katalaz pozitif olan 9 suşun ise başka bir *B. fragilis* grubu üyesi olduğu anlaşıldı ancak ileri identifikasyonları yapılamadı. Besiyerinde pigment oluşturmayan ve mikroskopik incelemede iğsi görünümündeki gram negatif basillerden 4 tanesi vankomisine dirençli, kanamisin ve kolistine duyarlı idi. Bu suşlardan 3 tanesi besiyerinde ekmek kıvrıntısı görünümünde idi ve yapılan indol testi de pozitif idi. Koloni morfolojisi spesifik olmayan ve indol testi pozitif olan 1 suşun ise *Fusobacterium* spp. olduğu anlaşıldı, ancak ileri identifikasyonu yapılamadı. Vankomisine duyarlı, kanamisin ve kolistine dirençli, BSE agarda üremeyen, besiyerinde pigment oluşturmayan, diğer biyokimyasal testlerinin hepsi negatif sonuçlanan 2 adet suş daha ileri identifikasyon testleri yapılamadığından tanımlanamadı.

Kolonileri çok küçük olan ve gram boyalı preparatın mikroskopik incelenmesinde gram negatif kok görünümündeki 3 suşa nitrat testi uygulandı. Bu suşlardan 2 tanesinin nitrat testi pozitif olduğu görüldü ve *Veillonella* spp. olarak identifiye edildi ancak kalan bir gram negatif kok suşu tanımlanamadı.

Gram boyalı preperatta yapılan incelemede 18 suşun gram pozitif kok olduğu görüldü. Bu suşlar öncelikle SPS diski ile incelendi, 3 suşun SPS'ye duyarlı olduğu anlaşıldı ve *Peptostreptococcus anaerobius* olarak tanımlandı. Kalan 15 suş L-pirolidonil arilamidaz (PYR), spot indol, üreaz ve nitrat testleriyle incelenmiş olup; PYR testi pozitif olan 8 suşun *Finegoldia magna* ya da *Parvimonas micra* olduğu anlaşıldı ancak ileri identifikasyonları yapılamadı. Suşların tamamının indol, üreaz ve nitrat testleri ise negatif olarak sonuçlandırıldığından kalan gram pozitif kokların daha ileri identifikasyonları yapılamadı.

Mikroskopik incelemede gram negatif basil görünümünde olan ancak morfolojik olarak diğer gram negatiflere benzemeyen kalınlıkta olduğu görülen 1 suşun *Clostridium* spp. olduğu anlaşıldı. İndol, üreaz ve nitrat testleri de negatif olan bu bakterinin *C. ramosum* ya da *C. clostridioforme* grubundan olduğu anlaşıldı ancak daha ileri identifikasyonu yapılamadı.

Kanlı besiyerinde çift hemoliz zonu oluşturan, mikroskopik incelemede kalın ve sporlu olduğu görülen 1 adet suşun *C. perfringens* olduğu anlaşıldı. Geriye kalan suşlardan 2 tanesi mikroskopik incelemede difteroid görünümünde olduğundan katalaz ve spot indol testleri yapılmış, her iki testin de pozitif sonuçlanması nedeniyle *Cutibacterium acnes* (eski adı *Propionibacterium acnes*) olduğu anlaşıldı. Dallanmış basil yapısında görülen 3 adet suş *Actinomyces* spp. olarak tanımlandı. Kalan 2 adet suş ise mikroskopik ve koloni morfoloji özellikleri spesifik olmadığından ileri identifikasyonları yapılamadı.

Toplamda 69 suş konvansiyonel yöntemlerle çalışılmış olup; 6 (%8,7) tanesi tür düzeyinde (3 adet *P. anaerobius*, 2 adet *C. acnes*, 1 adet *C. perfringens*), 49 (%71) tanesi cins ya da grup düzeyinde (15 adet *B. fragilis* grubu, 11 adet pigment oluşturmeyen *Prevotella* spp., 5 adet pigment oluşturan *Prevotella* spp., 4 adet *Fusobacterium* spp., 3 adet *Actinomyces* spp., 2 adet *Porphyromonas* spp., 2 adet *Veillonella* spp., 1 adet *Clostridium* spp.) tanımlanmıştır. Kalan suşlardan 8 (%11,6) tanesinde 2 tür (*F. magna* ve *P. micra*) arasında kalınmış, 10 (%14,5) suş gram boyama düzeyinde tanımlanabilmiştir. *A. rimae* ve *E. catenaformis* suşları (%2,9) ise tanımlanamamıştır. Konvansiyonel yöntemlerin çalışmadaki diğer yöntemlerle karşılaştırıldığı Tablo 17 bölüm sonunda verilmiştir.

4.2. OTOMATİZE SİSTEM BULGULARI

Otomatize yöntem olarak Vitek 2 sistemi kullanıldı. Anaerop bakterilerin identifikasyonu amacıyla 67'si klinik suş, 1'i *Bacteroides fragilis* ATCC 25285™, 1'i *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586™ olmak üzere toplam 69 adet anaerop bakteri çalışıldı. Bu suşların 36'sında (%52,1) tür düzeyinde (1'i standart suş olan 8 adet *B. fragilis*, 6 adet *F. magna*, 4 adet *Peptoniphilus asaccharolyticus*, 3'er adet *P. bivia*, *P. anaerobius*, 1'i standart suş olan 2 adet *F. nucleatum*, 2'şer adet *P. micra*, *C. acnes*, birer adet *P. veroralis*, *P. nigrescens*, *P. melaninogenica*, *F. varium*, *A. rimae*, *E. catenaformis*), 54'ünde (%78,2) cins düzeyinde identifikasyon sağlandı. Vitek 2 sistemi ile 6 (%8,7) anaerop bakteri ise tanımlanamadı. Bunlar *B. thetaiotaomicron* (4 suş), *P. asaccharolytica* (2 suş), *P. denticola* (1 suş), *C. perfringens* (1 suş) ve *C. clostridioforme* (1 suş) idi.

Konvansiyonel yöntemler ve Vitek 2 sistemi ile MALDI-TOF MS yönteminin karşılaştırılması Tablo 15'te verilmiştir. Her iki yöntem birlikte ele alındığında; MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde identifiye edilen 69 anaerop bakteriden 37'si (%53,6) tür düzeyinde, 65'i (%94,2) ise cins düzeyinde tanımlanmış oldu.

Vitek 2 sisteminin çalışmadaki diğer yöntemlerle karşılaştırıldığı Tablo 17 bölüm sonunda verilmiştir.

Tablo 15. Anaerop bakterilerin identifikasyonunda MALDI-TOF MS ve Konvansiyonel + Vitek 2 yöntemlerinin kombine sonuçları ile karşılaştırılması

Bakteri adı		Konvansiyonel + Vitek 2		MALDI-TOF MS yöntemi*
		Tür	Cins	
Gram negatifler	<i>Prevotella spp.</i>	6	10	16
	<i>B. fragilis</i> grubu	8	6	14
	<i>Fusobacterium spp.</i>	3	0	4
	<i>Porphyromonas spp.</i>	0	2	2
	<i>Veillonella spp.</i>	0	3	3
Gram pozitifler	<i>F. magna</i>	6	0	6
	<i>P. anaerobius</i>	3	0	3
	<i>P. asaccharolyticus</i>	4	0	4
	Diğer GPAK**	2	2	5
	<i>Clostridium spp.</i>	1	2	4
	<i>Actinomyces spp.</i>	0	3	3
	<i>C. acnes</i>	2	0	2
	<i>A. rimae</i>	1	0	1
	<i>E. catenaformis</i>	1	0	1
TOPLAM		37	65	69

* : Koloniden direkt MALDI-TOF MS ile tüm bakteriler tür düzeyinde tanımlanmıştır.

** : Gram pozitif anaerop koklar

4.3. MALDI-TOF MS İLE KAN KÜLTÜRÜ ŞİŞESİNDEN DİREKT İDENTİFİKASYON BULGULARI

Optimizasyon çalışmaları neticesinde oluşturulan prosedür ile 67 klinik suş ve 2 standart suş, kan kültürü cihazından pozitif sinyal alındıktan sonra direkt olarak kan kültürü şişelerinden identifikasyon amacıyla çalışıldı. MALDI-TOF MS ile koloniden çalışılan yöntemle karşılaştırıldığında; bu suşlardan 43 (%62,3) tanesinde tür düzeyinde, 47 (%68,1) tanesinde ise cins düzeyinde aynı sonuca ulaşıldı. Anaerop suşların her iki yöntemdeki sonuçları Tablo 16’da verilmiştir.

Kan kültürü şişesinden MALDI-TOF MS ile direkt identifikasyon yönteminde rutinde kullanılan koloni yöntemiyle karşılaştırıldığında; gram negatif anerop bakterilerden 8 adet *B. fragilis*, 3’er adet *P. bivia*, *B. thetaiotaomicron*, *V. dispar*, 2’şer adet *P. veroralis*, *B. ovatus*, *P. asaccharolytica*, 1 adet *P. buccae* suşları ile gram pozitif anerop bakterilerden 5 adet *F. magna*, 3 adet *A. vaginalis*, 2’şer adet *P. asaccharolyticus*, *P. micra*, *C. acnes*, 1’er adet *P. anaerobius*, *C. perfringens*, *A. turicensis*, *A. europaeus*, *A. rimae* suşlarının her iki yöntemle de tür düzeyinde tanımlandığı tespit edildi. MALDI-TOF MS ile kan kültürü şişesinden direkt identifikasyon yöntemi ile *P. melaninogenica*, *P. nigrescens*, *P. loeschii*, *P. denticola*, *F. nucleatum*, *F. varium*, *C. ramosum*, *C. clostridioforme* ve *E. catenaformis* tanımlanamadı.

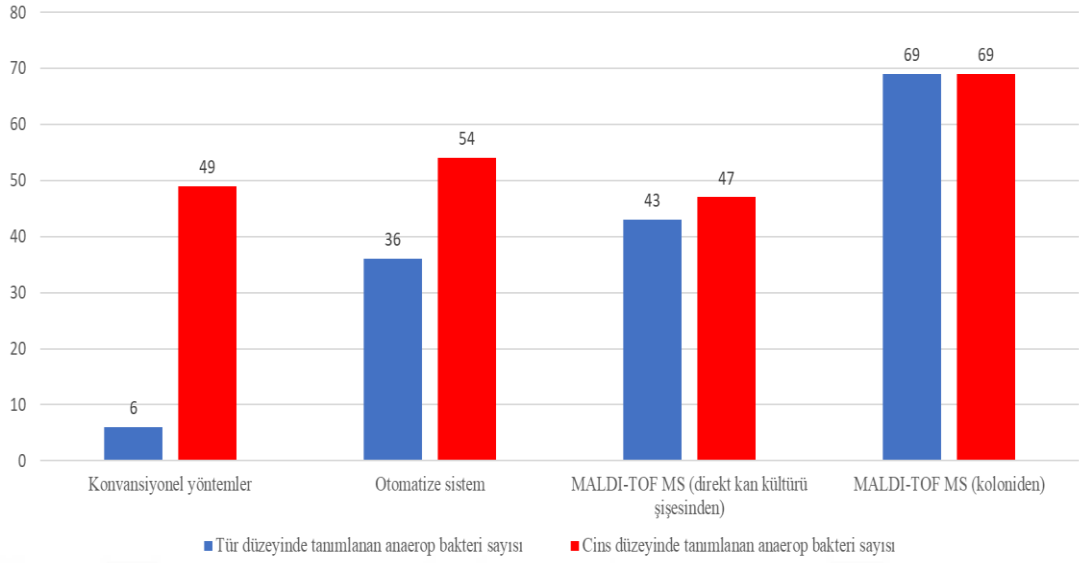
Çalışmamızda anaerop bakterilerin identifikasyonu amacıyla uyguladığımız tüm yöntemlerin karşılaştırılması Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 16. Anaerop bakterilerin MALDI-TOF MS ile koloniden ve direkt kan kültür şişesinden identifikasyonunun karşılaştırılması

Bakteri adı		Direkt identifikasyon			Koloniden
		Tür	Cins	Tanımlanamayan	Tür
Gram negatifler	<i>Prevotella</i> spp.	6	2	8	16
	<i>Bacteroides</i> spp.	13	1	1	15
	<i>Fusobacterium</i> spp.	0	0	4	4
	<i>Porphyromonas</i> spp.	2	0	0	2
	<i>V. dispar</i>	3	0	0	3
Gram pozitifler	<i>F. magna</i>	5	0	1	6
	<i>P. anaerobius</i>	1	0	2	3
	<i>P. asaccharolyticus</i>	2	0	2	4
	<i>P. micra</i>	2	0	0	2
	<i>A. vaginalis</i>	3	0	0	3
	<i>Clostridium</i> spp.	1	0	3	4
	<i>Actinomyces</i> spp.	2	1	0	3
	<i>C. acnes</i>	2	0	0	2
	<i>A. rimae</i>	1	0	0	1
	<i>E. catenaformis</i>	0	0	1	1
TOPLAM		43	47	22	69

Tablo 17. Anaerop bakterilerin konvansiyonel yöntemler, Vitek 2 sistemi, MALDI-TOF MS yöntemi ile hem koloniden hem de direkt kan kültür şişesinden yapılan identifikasyonunun karşılaştırılması

Bakteri adı		Konvansiyonel yöntem		Vitek 2 sistemi		MALDI-TOF MS		
		Tür	Cins	Tür	Cins	Direkt şişeden		Koloniden (Tür)
						Tür	Cins	
Gram negatif anaeroplara	<i>B. fragilis</i>	0	9	8	0	8	1	9
	<i>B. thetaiotaomicron</i>	0	4	0	0	3	0	4
	<i>B. ovatus</i>	0	2	0	1	2	0	2
	<i>P. bivia</i>	0	3	3	0	3	0	3
	<i>P. veroralis</i>	0	3	1	2	2	1	3
	<i>P. buccae</i>	0	2	0	1	1	0	2
	<i>P. intermedia</i>	0	2	0	1	0	1	2
	<i>P. melaninogenica</i>	0	2	1	1	0	0	2
	<i>P. nigrescens</i>	0	2	1	1	0	0	2
	<i>P. loeschii</i>	0	1	0	1	0	0	1
	<i>P. denticola</i>	0	1	0	0	0	0	1
	<i>V. dispar</i>	0	2	0	3	3	0	3
	<i>P. asaccharolytica</i>	0	2	0	0	2	0	2
	<i>F. nucleatum</i>	0	3	2	0	0	0	3
	<i>F. varium</i>	0	1	1	0	0	0	1
Gram pozitif anaeroplara	<i>F. magna</i>	0	0	6	0	5	0	6
	<i>A. vaginalis</i>	0	0	0	2	3	0	3
	<i>P. micra</i>	0	0	2	0	2	0	2
	<i>C. acnes</i>	2	0	2	0	2	0	2
	<i>A. turicensis</i>	0	2	0	2	1	1	2
	<i>A. europaeus</i>	0	1	0	1	1	0	1
	<i>A. rimae</i>	0	0	1	0	1	0	1
	<i>P. asaccharolyticus</i>	0	0	4	0	2	0	4
	<i>P. anaerobius</i>	3	0	3	0	1	0	3
	<i>C. perfringens</i>	1	0	0	0	1	0	1
	<i>C. ramosum</i>	0	0	0	2	0	0	2
	<i>C. clostridioforme</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>E. catenaformis</i>	0	0	1	0	0	0	1	
TOPLAM	SAYI	6	49	36	54	43	47	69
	YÜZDE	%8,7	%71	%52,1	%78,2	%62,3	%68,1	%100



Şekil 2. Anaerop bakterilerin konvansiyonel yöntemler, Vitek 2 sistemi, MALDI-TOF MS yöntemi ile hem koloniden hem de direkt kan kültür şişesinden yapılan identifikasyonunun karşılaştırılması

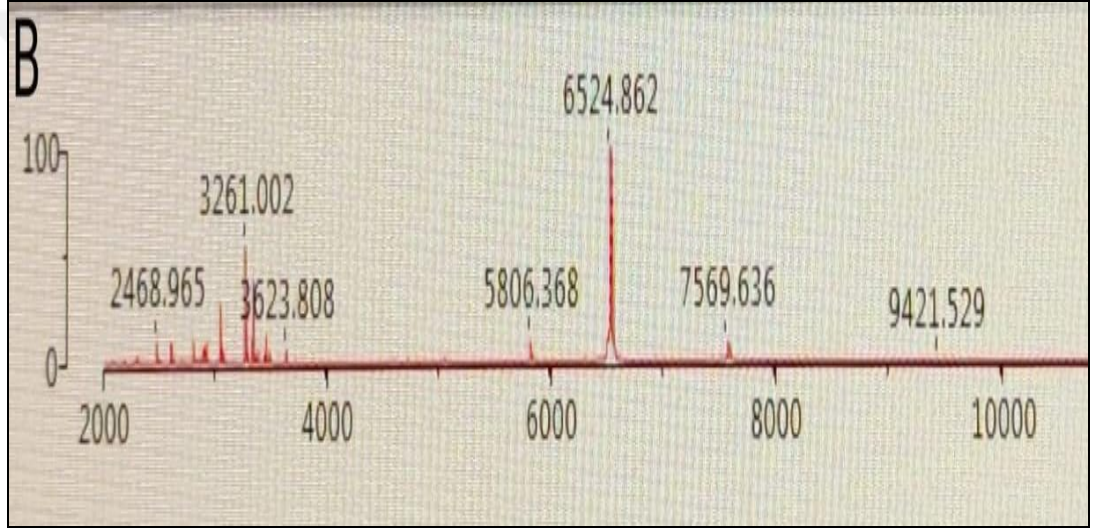
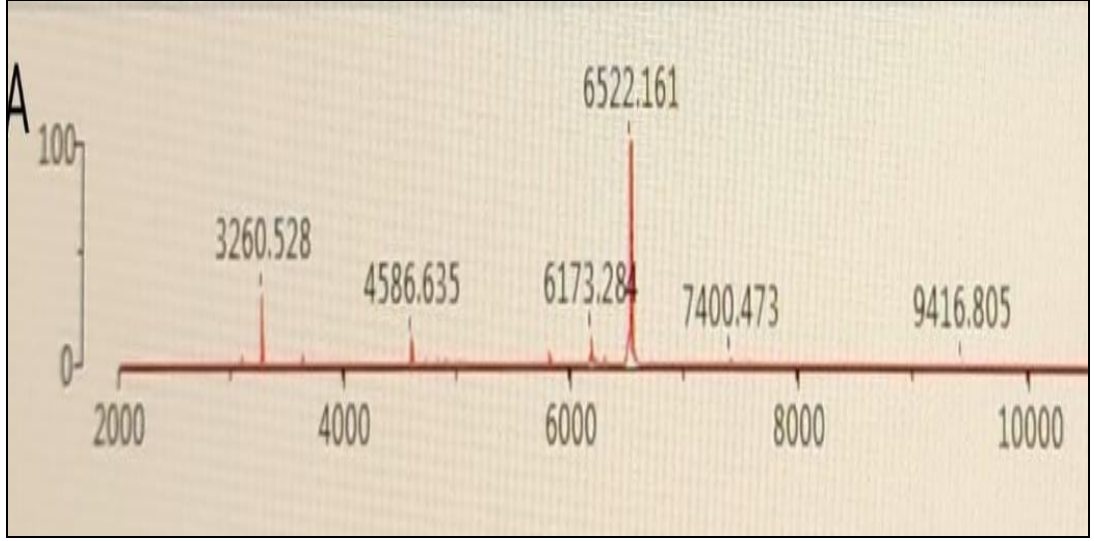
MALDI-TOF MS koloniden olan yöntem referans kabul edildiğinde konvansiyonel yöntem, Vitek 2 sistemi ve kan kültürü şişesinden direkt identifikasyonun uyum oranları sırasıyla; %71, %76,8 ve %68,1 olarak bulundu. Aynı şekilde uyum oranları gram negatifler için sırasıyla; %97,5, %70 ve %67,5 iken gram pozitifler için %34,4, %89,6 ve %68,9 idi. Anaerop bakterilerin identifikasyonunda konvansiyonel yöntemler + Vitek 2 yöntemlerinin kombine sonuçları MALDI-TOF MS yöntemi ile karşılaştırıldığında uyum oranının %94,2 olduğu görüldü. Her üç yöntemin de bir bakteriyi başka bir tür veya cins ile karıştırmadığı tespit edilmiştir.

Konvansiyonel yöntemler ile en doğru sonuçların alındığı bakteriler *P. anaerobius*, *C. acnes* ve *C. perfringens* (%100) olurken; *A. rimae* ve *E. cateniformis* suşları tanımlanamadı. Vitek 2 sistemi ile en doğru sonuçların alındığı bakteriler ise *F. magna*, *P. asaccharolyticus*, *P. anaerobius*, *P. bivia*, *C. acnes*, *P. micra*, *F. varium*, *A. rimae*, *E. cateniformis* (%100) ve *B. fragilis* (%88,8) olurken; *B. thetaiotaomicron*, *P. denticola*, *P. asaccharolytica*, *C. perfringens* ve *C. clostridioforme* bu yöntemle tanımlanamadı. MALDI-TOF MS ile kan kültürü şişesinden direkt olarak identifikasyonda *B. fragilis* (9/9) başarı oranının en yüksek

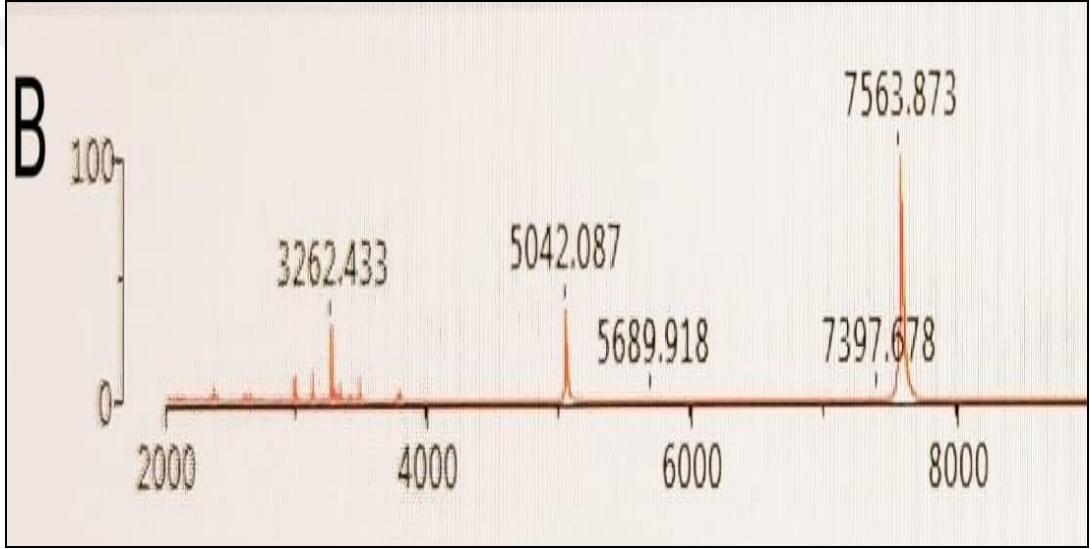
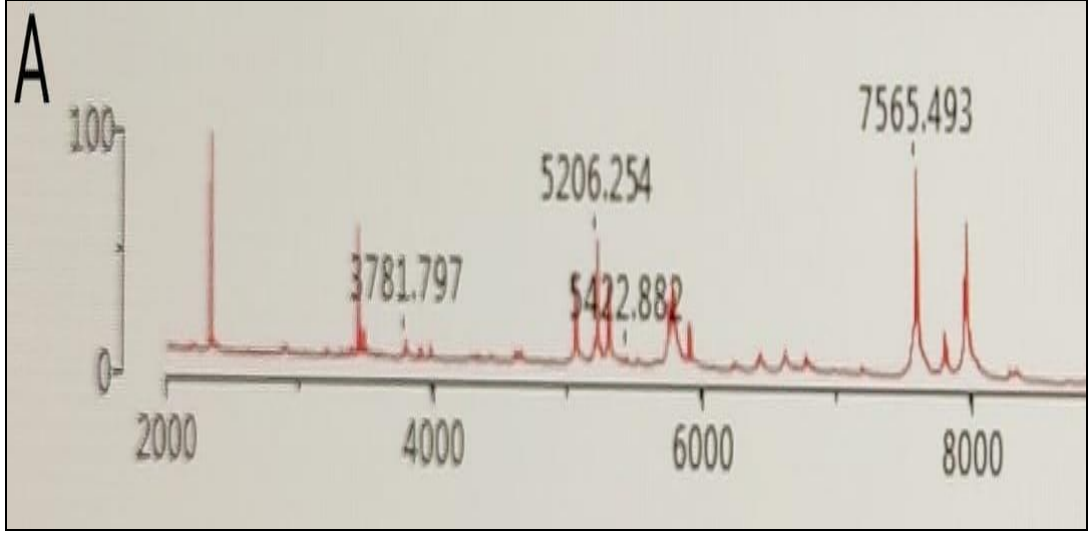
olduğu anaerop olurken; *B. ovatus*, *P. bivia*, *P. veroralis*, *V. dispar*, *P. asaccharolytica*, *A. vaginalis*, *P. micra*, *C. acnes*, *A. europaeus*, *A. rimae* ve *C. perfringens* suşlarının tamamı (%100) da bu yöntemle doğru olarak tanımlandı. *Fusobacterium spp.* (%0) ise başarı oranının en düşük olduğu anaerop olmuştur.

Anaerop bakterilerin koloniden MALDI-TOF MS ile identifikasyonunda elde edilen kütle spektrumlarının kan kültür şişesinden direkt identifikasyonunda elde edilenlere benzer olduğu görüldü. Bazı anaeropların bu tez çalışmasında MALDI-TOF MS yöntemi ile koloniden ve direkt olarak kan kültürü şişesinden identifikasyonunda elde edilen kütle spektrumları Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6'da verilmiştir.

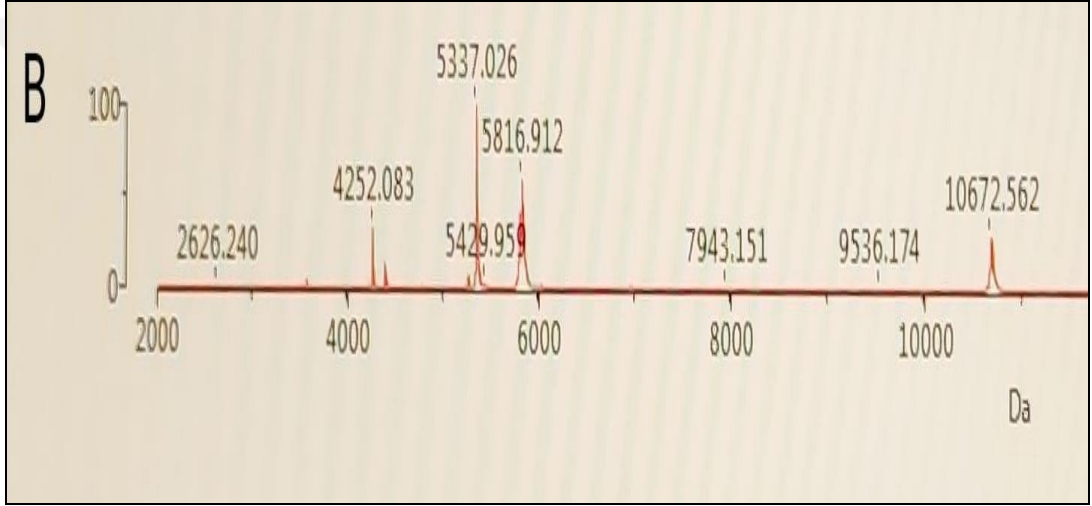
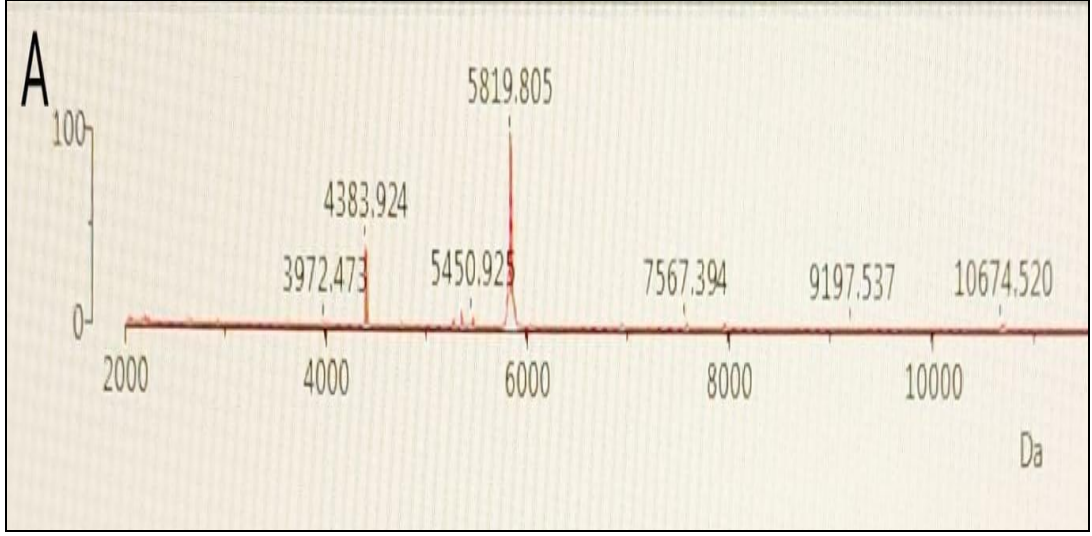




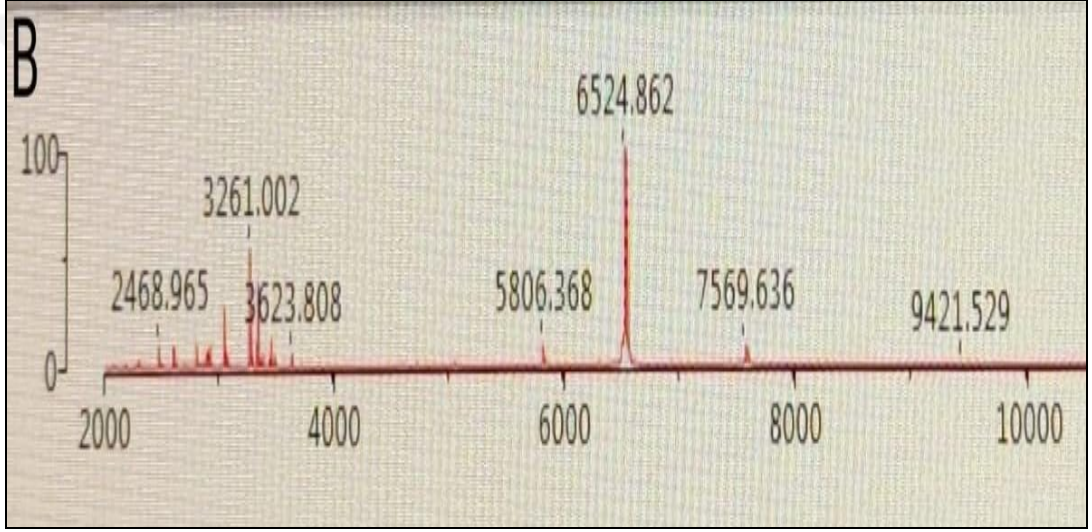
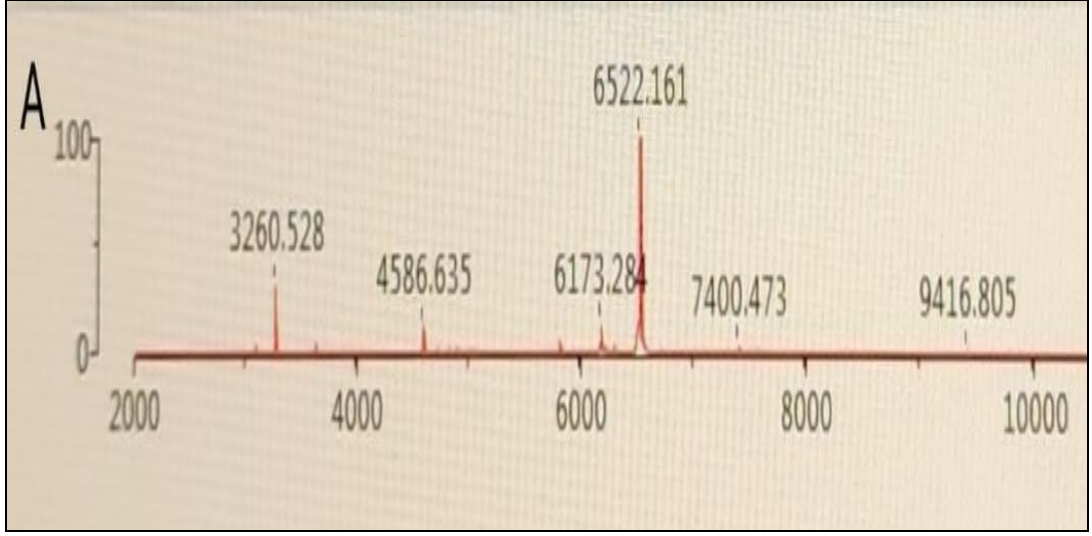
Şekil 3. *Bacteroides fragilis*'in MALDI-TOF MS ile elde edilen kütle spektrumu
A: Koloniden işlem yapıldığında elde edilen kütle spektrumu,
B: Direkt identifikasyon yöntemi ile elde edilen kütle spektrumu.



Şekil 4. *Prevotella bivia*'nın MALDI-TOF MS ile elde edilen kütle spektrumu
A: Koloniden işlem yapıldığında elde edilen kütle spektrumu,
B: Direkt identifikasyon yöntemi ile elde edilen kütle spektrumu.



Şekil 5. *Finegoldia magna*'nın MALDI-TOF MS ile elde edilen kütle spektrumu
A: Koloniden işlem yapıldığında elde edilen kütle spektrumu,
B: Direkt identifikasyon yöntemi ile elde edilen kütle spektrumu.



Şekil 6. *Peptostreptococcus anaerobius*'un MALDI-TOF MS ile elde edilen kütle spektrumu

A: Koloniden işlem yapıldığında elde edilen kütle spektrumu,

B: Direkt identifikasyon yöntemi ile elde edilen kütle spektrumu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Anaerop bakteriler, neden oldukları enfeksiyonlar sonucu ciddi morbidite ve mortaliteye yol açabilmektedir. Örneğin anaerobik bakteriyemide mortalite oranı %40 civarındadır (Kim et al. 2016). Bu nedenle anaerop bakterilerin mikrobiyoloji laboratuvarlarında en kısa sürede izole edilmesi, identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının saptanması çok önemlidir. Klinisyenin anaerop bakterilerin neden olduğu enfeksiyondan şüphelenmesinden mikrobiyoloğun etken olan bakteriyi tanımlamasına kadar geçen süreçteki tüm faktörler anaerobik bakterilerin doğru tanımlanması için optimum olmalıdır (Brook et al. 2013, Gajdács et al. 2017). Konvansiyonel yöntemlere göre daha kısa süren bir yöntem olması, iş yükünün az olması, tecrübeli personel gerektirmemesi, bir kez cihaz alındığında sonraki işlemlerin maliyetinin az olması gibi nedenlerle son yıllarda MALDI-TOF MS kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Bu tez çalışmasında anaerop bakterilerin MALDI-TOF MS ile besiyerindeki kolonilerden ve kan kültürü şişesinden direkt olarak identifikasyonu amaçlanmıştır.

Çoğunlukla normal mikrobiyota üyeleri olan anaerop bakterilerin etken olarak izole edildiği örnek türleri arasında derin yara örnekleri, eklem sıvısı, periton mayisi, kan ve diğer steril vücut sıvıları sayılabilir (Park et al. 2009, Shenoy et al. 2017, Cobo et al. 2020). Klinik örneklerden en çok izole edilen anaerop bakteriler *Bacteroides fragilis* grubu üyeleri başta olmak üzere gram negatiflerdir. Bunun yanında gram pozitif anaerop bakteriler de etken olabilmektedir (Ananth-Shenoy et al. 2016). Wybo ve ark. (2014), Belçika'daki dört farklı merkezde yaptıkları bir çalışmada 403 anaerop bakterinin 279'unun (%69,2) apse ve diğer yara örneklerinden, 42'sinin (%10) kandan, 8'inin (%2) BOS'tan izole edildiğini bildirmiştir. En çok izole ettikleri suşlar *Bacteroides* ve *Parabacteroides* spp. (%45) ile GPAK (%18) olmuştur. Jeverica ve ark. (2017), laboratuvarında ürettikleri 2673 anaerop suşun

%57'sinin deri ve yumuşak dokudan, %21'inin abdominal örneklerden, %4'ünün kandan izole edildiğini; Schaedler agar ve neomisin-vankomisinli Schaedler agara ektikleri bu örneklerden en fazla izole edilen anaeroplardan ise *Bacteroides* spp. (%31), *Prevotella* spp. (%14), *Fusobacterium* spp. (%7) gibi gram negatif anaeroplardan ile GPAK (%22) olduğunu bildirmişlerdir. Li ve ark. (2019), yayınladıkları metaanalizde; en sık kullanılan besiyerlerinin brusella agar ve Columbia agar olduğunu; 6685 anaerop suştan en çok izole edilenlerin *Bacteroides* spp. (%29,2), *Clostridium* spp. (%23,9) ve *Propionibacterium* spp. (%9,1) olduğunu bildirmişlerdir.

Yurtdışı veriler bu şekilde iken ülkemizde de anaerop bakterilerle ilgili çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Uysal ve ark. (2014), retrospektif araştırmaları sonucu yedi yıl boyunca anaerop istemle laboratuvara gelen 543 klinik örnek arasında en çok apse ve yara kültüründen (%53) anaerop bakteri izole edildiğini bildirmişlerdir. Anaerobik kanlı agar ve Schaedler agar kullanılarak izole edilen 134 anaerop arasında en çok *Bacteroides* spp. (%29,9) ve *Peptostreptococcus* spp. (%23,1) ürettiğini söylemişlerdir. Benzer şekilde Erçiş ve ark. (2005) 217 anaerop üremenin 102'sinin, Kiremitçi ve ark. (2008) 33 anaerop üremenin 15'inin ve Şengöz ve ark. (2005) 127 anaerop üremenin 61'inin apse örneklerinden ve en çok izole edilen anaerop bakterinin *Bacteroides* spp. olduğunu bildirmişlerdir. Tunçkanat ve ark. (2019), periodontitli hastalardan Schaedler kanlı agarda izole ettikleri 34 anaerop bakteriden en çok *Prevotella* spp. (%32,3) ürettiğini bildirmişlerdir. *P. asaccharolytica*, *Fusobacterium* spp., *Veillonella* spp., *C. acnes* bildirilen diğer anaerop izolatlar arasındadır. Bahar ve ark. (2003), 526 yara örneğini inceledikleri çalışmalarında, örneklerde en fazla üreyen anaerop bakterilerin *Clostridium* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp. ve *Bacteroides* spp. olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında da anaerobik kanlı agar ve Schaedler kanlı agar kullanılarak izole edilen anaerop bakterilerin çoğu (%83,8) yukarıdaki yayınlara benzer şekilde apse ve doku materyali gibi yara örneklerinden üretilmiştir. Klinik örneklerden en çok izole edilen anaerop suşlar ise *Prevotella* spp. (%23,5) ve *Bacteroides fragilis* grubu üyeleri (%20,5) olmuş; bunların yanında diğer gram negatif anaeroplardan 9 izolat (%13,2), GPAK'den 18 izolat (%26,4), spor oluşturmayan gram pozitif basillerden 7 izolat (%10,3) ve 4 (%5,8) *Clostridium* spp.

üretmiştir. Bu çalışmadaki anaerop bakteri türlerinin dağılımının da (*Prevotella* spp. hariç) diğer çalışmalarla paralel olduğu görülmektedir.

Anaerop bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle identifikasyonunda biyokimyasal testler kullanılmaktadır. Bu testlerin uygulanmasının zahmetli ve zaman alıcı olmasının yanı sıra anaerop bakterilerin identifikasyonu bu testlerle her zaman mümkün olmamaktadır. Vitek 2 benzeri otomatize sistemlerde konvansiyonel yöntemlere göre nispeten daha az iş yükü gerekmekte olup, çok sayıda enzimatik/biyokimyasal test bir arada yapılarak daha kısa sürede sonuç alınabilmektedir (Gajdács et al. 2017). Uysal ve ark. (2014), yarı otomatize BBL Crystal sistemi (BecktonDickinson, ABD) ile 134 anaerop bakteriyi tanımladıklarını bildirmişlerdir. Mory ve ark. (2009), klinik örneklerden izole edilen 261 anaerop suşun Vitek 2 ANC kartıyla identifikasyonunu hedeflemişler; bunlardan 251'inin (%96,1) tür ve cins düzeyinde doğru olarak tanımlandığını, 10'unun (%3,8) ise tanımlanamadığını ya da yanlış tanımlandığını bildirmişlerdir. Lee ve ark. (2011), 301 anaerop bakteri suşunun identifikasyonunda Vitek 2 ANC kart sisteminin performansını araştırmışlardır. Buna göre 76 *B. fragilis* grubu üyesinin 68'ini (%89,5) tür düzeyinde, 7'sini (%9,2) cins düzeyinde; 55 GPAK üyesinin 54'ünü (%98,2), 15 adet *Propionibacterium acnes* suşunun 13'ünü (%86,7) tür düzeyinde doğru olarak tanımladıklarını, 20 (%6,6) anaerop bakteri suşunun yanlış tanımlandığını, 100 suşun ise veritabanında yer almadığından tanımlanamadığını bildirmişlerdir. Li ve ark. (2014), MALDI-TOF MS ile karşılaştırmak amacıyla anaeroplari Vitek 2 ANC kartıyla tanımlamışlar; buna göre 31 *Bacteroides* spp.'den 30'unu (%96,7), 5 GPAK'nin tamamını (%100), toplamda ise 50 bakteriden 43'ünü (%86) tür ve cins düzeyinde doğru tanımladıklarını, 3 (%6) tanesini ise tanımlayamadıklarını bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında MALDI-TOF MS ile kıyaslamak amacıyla konvansiyonel yöntemler ve Vitek 2 ANC kartı kullanılarak 69 anaerop bakteri suşunun identifikasyonu hedeflenmiş; 9 *B. fragilis* grubu üyesinden 8'i (%88,8), 16 *Prevotella* spp.'den 6'sı (%37,5), 9 diğer gram negatiflerden 2'si (%22,2), 18 GPAK üyesinden 14'ü (%77,7), 11 diğer gram pozitiflerden 5'i (%45,4) tür düzeyinde; 30 (%43,4) anaerop ise cins düzeyinde tanımlanmıştır. 4 suş veritabanında yer almaması nedeniyle tanımlanamamıştır.

Anaerop bakteriyel enfeksiyonların tanısında kültür halen altın standart yöntem olarak geçerliliğini korumakla birlikte zor olması, uzun sürmesi ve emek yoğun işlemler gerektirmesi nedeniyle anaerop bakteriler genellikle cins düzeyinde tanımlanıp rapor edilmektedir. Bununla birlikte MALDI-TOF MS'in keşfi, bakteriler izole edildikten sonra dakikalar içinde onları doğru olarak tanımlayan bir yöntem olarak mikrobiyoloji alanında çığır açmıştır (Lavigne et al. 2013). Anaerop bakterilerin yol açtığı bakteriyemi gibi invazif enfeksiyonlarda mortalitenin yüksek olması nedeniyle tanıda daha da hızlı metotlar araştırılmaktadır. Bu amaçla belli işlemlerin ardından bakteriler henüz izole edilmeden direkt olarak kan kültürü şişelerinden MALDI-TOF MS ile tanımlanabilmektedir. Ancak dünya genelinde kan kültürü şişesinden direkt olarak anaerop bakterilerin MALDI-TOF MS ile tanımlandığı az sayıda çalışma bulunmaktadır (yaklaşık 10 çalışma). Bu çalışmaların büyük bir çoğunluğu da son yıllarda yapılmış çalışmalardır. Ülkemizde ise aerop bakterilerin direkt olarak kan kültürü şişelerinden MALDI-TOF MS ile tanımlanması konusunda bazı yayınlar bulunmakla birlikte anaerop bakteriler için bu konuda henüz bir çalışma literatürde tespit edilememiştir.

Prod'hom ve ark. (2010), ekstraksiyon ajanı olarak amonyum klorid kullandıkları çalışmada 122 bakterinin 96'sını (%78,7) MALDI-TOF MS ile kan kültürü şişesinden direkt olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir. Bunlardan 3 tanesi anaerop olup sadece 1 *Fusobacterium necrophorum* suşunu (%33,3) tanımlamışlardır. Ferreira ve ark. (2011), etanol/formik asit ekstraksiyon metodunu kullanarak gram negatif bakterilerin %83,3'ünü, gram pozitif bakterilerin ise %31,8'ini tür düzeyinde tanımladıklarını bildirmişlerdir. Cins düzeyinde ise bu oranlar sırasıyla %96,6 ve %64,8 olmuştur. Li ve ark. (2019), anaerop bakterilerin MALDI-TOF MS ile tanımlanmasını içeren 28 çalışmayı inceledikleri metaanalizde bu bakterilerin tür düzeyinde %84, cins düzeyinde ise %92 oranında doğru olarak tanımlandıklarını saptamışlardır. Varışlı ve ark. (2018), 162 idrar örneğini çalışmamıza benzer şekilde jelli tüp ve formik asit ekstraksiyonu metodunu kullanarak MALDI-TOF MS ile direkt olarak örnekten çalışmışlardır. *E. coli*, *K. pneumoniae* gibi *Enterobacterales* üyeleri, *E. faecalis*, *S. aureus* ile birlikte anaerop olan *Clostridium striatum* suşlarının tamamını (%100) bu yöntemle tanımlamayı başardıklarını bildirmişlerdir.

Jeverica ve ark. (2018), 2 farklı kan kültürü şişesi ve biri saponinli olmak üzere iki farklı yöntemle 240 anaerop bakteri suşunun MALDI-TOF MS ile direkt identifikasyonunu araştırmışlardır. Saponinli yöntemde; 40 *B. fragilis* grubu üyesi, 16 *Fusobacterium* spp., 12 *Prevotella* spp. ve 4 *Veillonella* spp.'nin tamamını (%100); 24 *Clostridium* spp.'nin 20'sini (%83,3), 12 diğer gram pozitif basillerin 1'ini (%8,3), 12 GPAK'nin 9'unu (%75) doğru olarak tanımlamışlardır. Diğer yöntemde ise; 40 *B. fragilis* grubu üyesinin 12'sini (%30), 16 *Fusobacterium* spp.'nin 12'sini (%75), 12 *Prevotella* spp. 9'unu (%75); 24 *Clostridium* spp.'nin 17'sini (%70,8), 12 diğer gram pozitif basillerin 5'ini (%41,6), 12 GPAK'nin tamamını (%100) doğru olarak tanımlamışlardır. *Lactobacillus rhamnosus* suşunun her iki yöntemle, 4 *Veillonella* spp.'nin ikinci yöntemle tanımlanamadığını bildirmişlerdir. Her iki yöntem ile toplamda 240 anaerop bakteriden 169'unun (%70,4) direkt olarak identifiye edildiği bildirilmiştir.

Azrad ve ark. (2019), 186 mikroorganizmanın iki farklı yöntemle direkt identifikasyonunu araştırmışlardır. Sepsityper kitiyle 12 anaerop bakterinin tamamının (%100), kendi geliştirdikleri yöntemle ise 9'unun (%75) doğru olarak tanımlandığını bildirmişlerdir. Çalışmada gram negatif bakterilerin doğru tanımlanma oranı sırasıyla %99 ve %95, gram pozitif bakterilerin doğru tanımlanma oranları %100 ve %92, mayaların doğru tanımlanma oranı ise %86 ve %43 olarak verilmiştir. Toplamda ise sırasıyla %99 ve %90 oranında mikroorganizmaları doğru tanımladıklarını bildirmişlerdir.

Kayin ve ark. (2019), çoğunluğunu aerop bakterilerin oluşturduğu 199 bakterinin MALDI-TOF MS ile direkt identifikasyonunu üç farklı yöntem [rapid BACpro® II (Nittobo Medical Co. Ltd., Tokyo, Japonya), Sepsityper® kit (Bruker Daltonics, Billerica, ABD) ve kendi geliştirdikleri yöntem] kullanarak araştırmışlardır. Rapid BACpro® II yöntemiyle 4 *B. fragilis*, 2 *P. acnes*, 1'er *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus* ve *P. micra* suşunu; Sepsityper® kit yöntemiyle 4 *B. fragilis*, 2 *P. acnes* suşlarını; kendi geliştirdikleri yöntemle ise 4 *B. fragilis*, 2 *P. acnes*, 1'er *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus* suşunu doğru olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir. Yayında anaerop suş sayısı ve doğru identifikasyon oranı verilmemiştir. Ancak toplamda doğru identifikasyon oranları rapid BACpro® II için %87,4, Sepsityper® kit için %73,8 ve kendi geliştirdikleri yöntem için %66,3 olarak bildirilmiştir.

Barberino ve ark. (2017), 538 aerop ve anaerop bakterinin direkt identifikasyonu amacıyla yaptıkları çalışmada, anaerop olarak 2 *B. fragilis* suşunun tamamını (%100), toplamda ise 538 bakterinin 460'ını (%83,9) saponin kullandıkları bir prosedürle kan kültürü şişelerinden MALDI-TOF MS ile doğru olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir. Almuhayawi ve ark. (2015), 4 farklı anaerobik kan kültürü şişesi kullanarak 67 anaerop bakterinin MALDI-TOF MS ile direkt identifikasyonunu hedefledikleri araştırmada; 42 (%62,7) anaerop bakteriyi tüm şişelerden doğru olarak tanımlamışlardır. Gram negatif anaerop bakterilerden 28 *B. fragilis* suşunun 23'ünü (%82,1), 7 *B. thetaiotaomicron* suşunun 6'sını (%85,7), 3'er *B. ovatus* ve *B. vulgatus* suşlarının 2'sini (%66,6); gram pozitiflerden ise 10 *C. perfringens* suşunun 6'sını (%60), 1'er *C. septicum*, *C. tertium* ve *Parabacteroides goldsteinii* suşlarının tamamını (%100) MALDI-TOF MS ile kan kültürü şişesinden direkt olarak tanımlamışlardır. Çalışmadaki suşlardan *F. nucleatum*, *Veillonella parvula*, *Veillonella atypica*, *Fusobacterium mortiferum*, *C. ramosum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium hathewayi* ve *Lactobacillus spp.*'yi ise bu yöntemle tanımlayamamışlardır. Bu yayının eksikliği olarak gram pozitif anaerop kokların çalışılmamasını göstermişlerdir.

Bu tez çalışmasında ikisi standart suş olan 69 anaerop bakterinin kan kültürü şişesinden direkt identifikasyonu hedeflenmiş; bunların 43'ü tür düzeyinde, 4'ü ise cins düzeyinde olmak üzere toplam 47 tanesi (%68,1) MALDI-TOF MS ile doğru olarak tanımlanmıştır. Gram negatif anaerop bakterilerden 9 *B. fragilis* suşunun 8'i (%88,8), 4 *B. thetaiotaomicron* suşunun 3'ü (%75), 3'er *P. bivia* ve *V. dispar* suşlarının tamamı (%100), 2'şer *B. ovatus* ve *P. asaccharolytica* suşlarının tamamı (%100), 3 *P. veroralis* suşunun 2'si (%66,6), 2 *P. buccae* suşunun 1'i (%50); gram pozitiflerden ise 6 *F. magna* suşunun 5'i (%83,3), 3 *A. vaginalis* suşunun tamamı (%100), 2'şer *P. micra* ve *C. acnes* suşlarının tamamı (%100), 4 *P. asaccharolyticus* suşunun 2'si (%50), 1'er *C. perfringens*, *A. europaeus* ve *A. rimae* suşlarının tamamı (%100), 3 *P. anaerobius* suşunun 1'i (%33,3), 2 *A. turicensis* suşunun 1'i (%50) MALDI-TOF MS ile kan kültürü şişelerinden direkt olarak tür düzeyinde tanımlanmıştır. Bu yöntemle 1'er adet *B. fragilis*, *P. veroralis*, *P. intermedia* ve *A. turicensis* suşları ise cins düzeyinde tanımlanmıştır. *P. nigrescens*, *P.*

melaninogenica, *P. loeschii*, *P. denticola*, *F. nucleatum*, *F. varium*, *C. ramosum*, *C. clostridioforme* ve *E. cateniformis* suşları ise bu yöntemle tanımlanamamıştır.

Bu çalışmada olduğu gibi çok sayıda anaerop bakteri türü ve bunların MALDI-TOF MS ile direkt olarak kan kültürü şişelerinden identifikasyonu literatürde yeni bir konudur. Bu çalışmada MALDI-TOF MS yönteminin kültürde izole edilen anaerop bakterilerin ve direkt olarak kan kültürü şişesinden anaerop bakterilerin identifikasyonunda başarıyla kullanılabilceği ve birçok avantajı olduğu tespit edilmiştir. Bu yöntem ile sonuç verme süresi oldukça kısalmakta ve direkt identifikasyon yönteminde kan kültürü şişesinin pozitif sinyal verdiği aynı gün içinde sonuç vermektedir. Duyarlılığı ve özgüllüğünün konvansiyonel yöntemler ve otomatize sistemlerden daha yüksek bulunması nedeniyle son yıllarda MALDI-TOF MS'in anaerop bakterilerin identifikasyonunda referans yöntem olma potansiyeli taşımaktadır. Referans yöntem olan dizi analizi yöntemine göre çok daha hızlı, maliyet etkin ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Bunun sonucunda tanı süresinin kısılması ile tedavi erken yönlendirildiğinden; mortalite ve morbidite oranlarının düşmesi, hastanede yatış süresinin kısılması, hasta bakım maliyetlerinin düşmesi, hekimlerin iş yükünün azalması gibi yararlar sağlanacaktır. Özellikle bakteriyemi ve peritonit gibi invazif enfeksiyonların hızlı tespit edilebilmesi önemli bir avantajdır. Bu konuda çalışmalar yapıldıkça ve moleküler çalışmalarla anaerop bakterilerin taksonomisi geliştikçe bu yöntem rutin kullanıma girme potansiyeline sahiptir.

Bu çalışmanın kısıtlılıkları arasında referans yöntem olan sekans çalışmasının yapılmamış olması, standart suş ve klinik izolat sayısının azlığı, şişeden direkt identifikasyonda lizis tamponlarının ve hazır ticari ürünlerin kullanılmamış olması sayılabilir. Ayrıca identifikasyonun MALDI-TOF MS cihazında yüklü bulunan bakteri kütle spektrumu kütüphanesiyle sınırlı olması da bir diğer handikapıdır.

Sonuç olarak;

Bu çalışmada MALDI-TOF MS yönteminin anaerop bakterilerin gerek koloniden gerekse de kan kültür şişesinden direkt olarak identifikasyonunda büyük başarıyla kullanılabilceği ve sonuç verme süresini oldukça kısalttığı tespit edilmiştir. Konvansiyonel yöntemler, hızlı enzimatik otomatize sistemler ve MALDI-TOF kütle spektrometrisi arasındaki sonuçların büyük oranda uyumlu olduğu; gram negatif bakterilerde gram pozitif bakterilere göre bu uyumun daha yüksek oranda meydana

geldiği tespit edilmiştir. Ancak kan kültür şişesinden direkt identifikasyon yönteminin standardizasyonu henüz sağlanabilmiş değildir. Kan kültürü şişesinden direkt olarak anaerop bakterilerin identifikasyonu konusunda daha detaylı ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

- Almuhayawi M, Altun O, Abdulmajeed AD, Ullberg M, Özenci V. (2015). The performance of the four anaerobic blood culture bottles BacT/ALERTFN, -FN Plus, BACTEC-plus and -lytic in detection of anaerobic bacteria and identification by direct MALDI-TOF MS. *PLoS ONE* 10:e0142398.
- Ananth-Shenoy P, Vishwanath S, Targain R, Shetty S, Sunil-Rodrigues G, Mukhopadhyay C, Chawla K. (2016). Anaerobic infections in surgical wards: A two year study. *Iran J Microbiol*, 8(3):181.
- Anhalt JP, Fenselau C. (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem*, 47:219–225.
- Aronoff, DM. (2013). Clostridium novyi, sordellii, and tetani: Mechanisms of disease. *Anaerobe*, 24,98-101.
- Azrad M, Keness Y, Nitzan O, Pastukh N, Tkhawkho L, Freidus V, Peretz A. (2019). Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology. *BMC Infect Dis*, 19(1):1-7.
- Bacic MK, Smith CJ. (2008). Laboratory maintenance and cultivation of *Bacteroides* species. *Curr Protoc Microbiol*, 9(1):13C-1.
- Bahar H, Mamal Torun M, Demirci M. (2003). Yara infeksiyonlarında anaerob bakterilerin dağılımı. XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Özet Kitabı, Antalya, Poster No: P:03-03.
- Barberino MG, Silva MDO, Arraes ACP, Correia LC., Mendes AV. (2017). Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Braz J Infect Dis*, 21(3):339-342.

- Bartlett JG. (2015). Anaerobic bacteria: History and role in normal human flora. In: *Anaerobic Bacterial Infections*, Calderwood SB and Thorner AR (Eds.), UpToDate, Waltham, MA, USA.
- Belizário JE, Napolitano M. (2015). Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front Microbiol*, 6:1050.
- Bilgehan H. (2008). Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. 12. baskı, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir, s.77-78.
- Bilgehan H. (2009). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5. baskı, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir.
- Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'homme G, Greub G. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol*, 49(2):693-696.
- Brazier JS, Smith SA. (1989). Evaluation of the Anoxomat: a new technique for anaerobic and microaerophilic clinical bacteriology. *J Clin Pathol*, 42(6):640-644.
- Brook I. (2010). The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe* 16:183–189.
- Brook I, Wexler HM, Goldstein EJ. (2013). Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*, 26(3):526-546.
- Cain TC, Lubman DM, Weber Jr WJ, Vertes A. (1994). Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 8:1026–1030.
- Cheng CW, Lin HS, Ye JJ, Yang CC, Chiang PC, Wu TS, Lee MH. (2009). Clinical significance of and outcomes for *Bacteroides fragilis* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect*, 42(3):243.

- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 26(3):547-603.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*, 9th Ed, M11, Wayne, PA.
- Cobo F, Borrego J, Gómez E, Casanovas I, Calatrava E, Foronda C, Navarro-Marí JM. (2020). Clinical findings and antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated in bloodstream infections. *Antibiotics*, 9(6):345.
- Cohen-Poradosu R, Kasper DL. (2015). Anaerobic infections: General concepts. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Mandell GL, Douglas JE, and Bennett R (Eds.). 8th ed, Elsevier Saunders, USA, vol.2:2736-2743.
- Coltella L, Mancinelli L, Onori M, Lucignano B, Menichella D, Sorge R, Russo C. (2013). Advancement in the routine identification of anaerobic bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32(9):1183-1192.
- Di Meo S, Venditti P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxid Med Cell Longev*, e9829176.
- Duerden BI. (1994). Virulence factors in anaerobes. *Clin Infect Dis*, 18(Suppl.4):S253-S259.
- Durmaz B. (2003). Anaerob bakterilerin identifikasyonunda sorunlar. XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, İstanbul, (16)1.
- Elssner T, Kostrzewa M, Maier T, Kruppa G. (2011). Microorganism identification based on MALDI-TOF-MS fingerprints. In: *Detection of Biological Agents for the Prevention of Bioterrorism*. Elssner T, Kostrzewa M, Maier T, Kruppa G (Eds.), Springer, Dordrecht, pp.99-113.

- Engelkirk PG, Engelkirk JD. (2007). Anaerobes of clinical importance. In: *Textbook of Diagnostic Microbiology*, Mahon CR, Manuselis G, Lehman DC (Eds.), 3th ed, USA: Saunders Company, St. Louis, p.587-640.
- Ercis S, Tunçkanat F, Haşçelik G. (2005). Anaerobik infeksiyon şüpheli hastalardan izole edilen anaerob bakteriler. *Mikrobiyol Bült*, 39: 447-54.
- Faron ML, Buchan BW, Ledebor NA. (2017). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: Methodology, performance, and optimization. *J Clin Microbiol*, 55(12):3328–3338.
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porrás-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. (2011). Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 17(4):546-51.
- Finegold SM. (1993). A century of anaerobes: A look backward and a call to arms. *Clin Infect Dis*, 16(Suppl. 4):pp.S453-S457.
- Finegold SM. (2000). Anaerobic infections: General concepts. In: *Principles and practice of infectious diseases* Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (Eds.), 5th ed, Churchill Livingstone, USA.
- Finegold SM. (2004). Changes in taxonomy, Anaerobes associated with humans, 2001-2004. *Anaerobe*, 10:309-312.
- Gajdács M, Spengler G, Urbán E. (2017) Identification and antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: Rubik’s cube of clinical microbiology? *Antibiotics*, 6(4):25.
- Gajdács M, Urbán E. (2020). Relevance of anaerobic bacteremia in adult patients: A never-ending story? *Eur J Microbiol Immunol*, 10(2):64–75.

- Garcia LS. (2010). Anaerobic bacteriology. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd Ed, Çeviren: Başustaoglu A, Yıldiran ŞT. Atlas Kitapçılık, Ankara.
- Guo P, Zhang K, Ma X, He P. (2020). Clostridium species as probiotics: Potentials and challenges. *J Anim Sci Biotechnol*, 11(1):1-10.
- Gürler N. (2001) Anaerop infeksiyonlara genel bakış ve antimikrobiyallare direnç durumu. *Ankem Derg*, 15(3):593-599.
- Gürler N. (2005). Anaerop infeksiyonlar ve laboratuvar tanısı. İçinde: *Anaerop bakteri infeksiyonları*. Ulusoy S, Leblebicioğlu H. (Ed.), Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, s.9-34.
- Gürler N. (2011). Pasteur, anaerobik yaşam ve fermentasyon. *Ankem Derg*, 25(Ek 2):1-4.
- Hall GS, Byrd L. (2016). Examination of Primary Culture Plates for Anaerobic Bacteria. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 4th ed, American Society of Microbiology, pp.4-5.
- Hecht DW. (2004) Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: Worrisome developments. *Clin Infect Dis*, 39(1):92-97.
- Hecht DW. (2006) Anaerobes: Antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe*, 12:115-121.
- Hindiyeh M, Acevedo V, Carroll KC. (2001). Comparison of three transport systems (Starplex StarSwab II, the new Copan Vi-Pak Amies Agar Gel collection and transport swabs, and BBL Port-A-Cul) for maintenance of anaerobic and fastidious aerobic organisms. *J Clin Microbiol*, 39(1):377-380.
- Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug*, 27(2):404-414.

- Isar J, Agarwal L, Saran S, Saxena RK. (2006). Succinic acid production from *Bacteroides fragilis*: Process optimization and scale up in a bioreactor. *Anaerobe*, 12(5-6):231-237.
- Jenkins SG. (2001). Infections due to anaerobic bacteria and the role of antimicrobial susceptibility testing of anaerobes. *Rev Med Microbiol*, 12(1):1-12.
- Jeverica S, Kolenc U, Mueller-Premru M, Papst L. (2017). Evaluation of the routine antimicrobial susceptibility testing results of clinically significant anaerobic bacteria in a Slovenian tertiary-care hospital in 2015. *Anaerobe*, 47:64-69.
- Jeverica S, Nagy E, Mueller-Premru M, Papst L. (2018). Sample preparation method influences direct identification of anaerobic bacteria from positive blood culture bottles using MALDI-TOF MS. *Anaerobe*, 54:231-235.
- Johnson MJ, Thatcher E, Cox ME. (1995). Techniques for controlling variability in gram staining of obligate anaerobes. *J Clin Microbiol*, 33(3):755-758.
- Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold MS. (2002) Specimen collection and anaerobic culture techniques. In: *Anaerobic Bacteriology Manual*. Star Publishing Company, California, p.23-42.
- Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom*, 8:53–68.
- Kayin M, Mert B, Aydemir S, Özenci V. (2019). Comparison of rapid BACpro® II, Sepsityper® kit and in-house preparation methods for direct identification of bacteria from blood cultures by MALDI-TOF MS with and without Sepsityper® module analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 38(11):2133-2143.
- Kıyan M. (1999). Anaerob bakteriler. İçinde: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ustaçelebi S (Ed), Güneş Kitabevi, Ankara, s.611-622.

- Kim J, Lee Y, Park Y, Kim M, Choi JY, Yong D, Jeong SH, Lee K. (2016). Anaerobic bacteremia: Impact of inappropriate therapy on mortality. *Infect Chemother.* 48(2):91-8.
- Kiremitçi A, Türkkan AA, Akgün Y, Durmaz G, Kaşifoğlu N. (2008). Klinik örneklerden anaerob bakterilerin soyutlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Ankem Derg*, 22:132-44.
- Kononen E, Wade WG, Citron DM. (2011). *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other anaerobic gram-negative rods. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed, ASM Press, Washington DC, p.858–880.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*, 34:1589–1596.
- Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. (2015). Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 28:208–236.
- Lassmann B, Gustafson DR, Wood CM, Rosenblatt JE. (2007). Reemergence of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis*, p:44-895.
- Lavigne JP, Espinal P, Dunyach-Remy C, Messad N, Pantel A, Sotto A. (2013). Mass spectrometry: A revolution in clinical microbiology? *Clin Chem Lab Med.* 51(2):257-70.
- Lee EHL, Degener JE, Welling GW, Veloo ACM. (2011). Evaluation of the Vitek 2 ANC Card for identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol*, 49(5): 1745–1749.
- Li Y, Gu B, Liu G, et al. (2014). MALDI-TOF MS versus VITEK 2 ANC card for identification of anaerobic bacteria. *J Thorac Dis*, 6: 517-523.

- Li Y, Shan M, Zhu Z, Mao X, Yan M, Chen Y, Gu B. (2019). Application of MALDI-TOF MS to rapid identification of anaerobic bacteria. *BMC Infect Dis*, 19(1):941.
- Lin YT, Vaneechoutte M, Huang AH, Teng LJ, Chen HM, Su SL, Chang TC. (2010). Identification of clinically important anaerobic bacteria by an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol*, 48(4):1283-1290.
- Lobo LA, Benjamim CF, Oliveira AC. (2016). The interplay between microbiota and inflammation: Lessons from peritonitis and sepsis. *Clin Transl Immunology*, 5(7):e90.
- Morris R, Schmidt TM. (2013). Shallow breathing: Bacterial life at low O₂. *Nat Rev Microbiol*, 11(3):205-212.
- Mory F, Alauzet C, Matuszeswski C, Riegel P, Lozniewski A. (2009). Evaluation of the new Vitek 2 ANC card for identification of medically relevant anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol*. 47(6):1923–1926.
- Murdoch DA. (1998). Gram-positive anaerobic cocci. *Clin Microbiol Rev*, 11(1):81-120.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. (2016). Medical microbiology. *Tıbbi Mikrobiyoloji*, 7th ed, Aslan G, Can F, Tunçkanat F, Pelikan Kitabevi, Ankara.
- Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ, McDermott L, Wagener MW, Harrell L, Snyderman DR. (2000). Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: Findings of a multicenter prospective observational trial. *Clin Infect Dis*, 30(6):870-876.
- Norin E. (2011) How normal is a “normal” flora in animal or man? *Anaerobe*, 17(6):431–2.
- Olsen I, Solberg CO, Finegold SM. (1999). A primer on anaerobic bacteria and anaerobic infections for the uninitiated. *Infection*, 27(3):159-165.

- Park Y, Choi JY, Yong D, Lee K, Kim JM. (2009). Clinical features and prognostic factors of anaerobic infections: A 7-year retrospective study. *Korean J Intern Med.* 24(1):13–18.
- Pence MA. (2019). Antimicrobial Resistance in Clinically Important Anaerobes. *Clin Microbiol Newsl*, 41(1):1-7.
- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. (2017). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Koneman Renkli Atlas ve Tanısal Mikrobiyoloji Kitabı. 7th ed, Ülger Toprak N, Kal Çakmaklıoğulları E, Yurttutan Uyar N, Güney M, Tunçkanat F, Kaşifoğlu N, Aydoğan H, Özen N, Hipokrat yayınevi, Ankara.
- Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol*, 48(4):1481-3.
- Rodríguez-Cavallini E, Vargas P, Rodríguez C, Quesada-Gómez C, Gamboa-Coronado MM. (2011). Phenotypic identification of over 1000 isolates of anaerobic bacteria recovered between 1999 and 2008 in a major Costa Rican hospital. *Clin Microbiol Infect*, 17(7):1043-1047.
- Roh KH, Kim JY, Kim HN, Lee HJ, Sohn JW, Kim MJ, Lee CK. (2012). Evaluation of BACTEC Plus aerobic and anaerobic blood culture bottles and BacT/Alert FAN aerobic and anaerobic blood culture bottles for the detection of bacteremia in ICU patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73(3):239-242.
- Rosenblatt JE. (1997). Can we afford to do anaerobic cultures and identification? A positive point of view. *Clin Infect Dis*, 25:127-131.
- Saat N. Klinik Örneklerden İzole Edilen Anaerob Bakterilerin Konvansiyonel Yöntem ve MALDİ-TOF MS ile Tiplendirilmesi ve Antibiyotik

- Duyarlılıkları. (2018). D.Ü. Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Diyarbakır, (Danışman: Prof. Dr. S Atmaca).
- Schleifer KH. (2009). Classification of bacteria and archaea: Past, present and future. *Syst Appl Microbiol*, 32(8):533-542.
- Schuetz AN. (2014). Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis*, 59(5):698-705.
- Shenoy PA, Vishwanath S, Gawda A, Shetty S, Anegundi R, Varma M, Chawla K. (2017). Anaerobic bacteria in clinical specimens—frequent, but a neglected lot: A five year experience at a tertiary care hospital. *J Clin Diagn Res*, 11(7):DC44-DC48.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*, 6:791.
- Speers AM, Cologgi DL, Reguera G. (2009). Anaerobic cell culture. *Curr Protoc Microbiol*, 12(1),A-4F.
- Şengöz G, Yaşar K, Berzeg D, Yıldırım F, Şengöz A, Elmi Ş, Durdu Y, Nazlıcan Ö. (2005). Klinik örneklerden izole edilen anaerob bakteriler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 35: 107-13.
- Tally FP, Goldin BR, Jacobus NV, Gorbach SL. (1977). Superoxide dismutase in anaerobic bacteria of clinical significance. *Infect Immun*, 16(1):20-25.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2:151–153.
- Taşkın Kafa AH, Çelik C, Hasbek M, Bakıcı MZ. (2020). MALDI-TOF MS mikrobiyoloji laboratuvarında anaerob tanımlamalarını artırdı mı? Bir üniversite hastanesi deneyimi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 40(2):196-202.

- Thwaites CL, Loan HT. (2015). Eradication of tetanus. *Br Med Bull*, 116(1):69-77.
- Tunçkanat F, Sancak B, Altun B, Dursun E, Akdoğan-Kittana FN. (2019). Investigation of antibiotic susceptibilities of anaerobic bacteria isolated from patients with chronic periodontitis. *Klinik Derg*, 32(3):240-4.
- Uysal EB, Çelik C, Alan Ç, Kaya H, Gözel MG, Bakıcı MZ. (2014). Klinik örneklerden izole edilen anaerobik bakteriler: Yedi yıllık değerlendirme. *Cumhuriyet Med J*, 36: 327-331.
- Ülger Toprak N. (2013). Anaeroplarda laboratuvar. İçinde: *Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Kitabı*, Altındış M (Ed.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s.211-222.
- Varışlı AN, Çetin-Hazırolan G, Aksoy A, Aksu-Koca N. (2018). İdrar örneklerinden MALDI-TOF MS sistemi ile direkt bakteri tanımlanması. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 75(2):101-108.
- Větrovský T, Baldrian P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PloS one*, 8(2):e57923.
- Walden WC, Hentges DJ. (1975). Differential effects of oxygen and oxidation reduction potential on the multiplication of three species of anaerobic intestinal bacteria. *Appl Microbiol*, 30(5):781-785.
- Wexler HM. (2007). Bacteroides: The good, the bad and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev*, 20:593-621.
- Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. (2008). Anaerop Bakterilerin Genel Özellikleri. İçinde: *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, Nobel tıp kitabevleri, İstanbul, (2):s.2319-62.
- Wybo I, Van den Bossche D, Soetens O, Vekens E, Vandoorslaer K, Claeys G, Glupczynski Y, Ieven M, Melin P, Nonhoff C, Rodriguez-Villalobos H, Verhaegen J, Piérard D. (2014). Fourth Belgian multicentre survey of

antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 69(1):155-161.

Yılmaz S, Duyan S, Artuk C, Diktaş H. (2014). Mikrobiyolojik tanımlamada MALDI-TOF MS uygulamaları. *TAF Prev Med Bull*, 13(5):421-426.

Zhang J, Zhang L, Loh KC, Dai Y, Tong YW. (2017). Enhanced anaerobic digestion of food waste by adding activated carbon: Fate of bacterial pathogens and antibiotic resistance genes. *Biochem Eng J*, 128:19-25.




EKLER

Ek 1. Sakarya Üniversitesi Etik Kurulu Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 26/02/2019-E.2383

* B E 6 P 4 U 1 6 H *

**T.C.**
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : 71522473/050.01.04/44
Konu : Girişimsel Olmayan Etik Kurul
Başvuru Dosyası Hk.


Sayın Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ
Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İlgi : 13.02.2019 tarihli 44 sayılı başvurunuz.

Destekleyicisi olduğunuz "Anaerobik Bakterilerin Tanımlanmasında Matriks Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisinin (MALDI-TOF MS) Değerlendirilmesi" isimli çalışmanın ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup; çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen şekilde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına etik kurul üyelerince karar verilmiştir.
Bilgilerinize rica ederim.






Prof.Dr. Hasan Çetin EKERBİÇER
Etik Kurulu Başkanı

Güvenli Elektronik
İmzalı Aslı İle Aynıdır.
26.02/2019

Yücel DEMİR
Etik Kurulu Sekr.


Evrak Doğrulama İçin : <http://193.140.253.232/envision.Sorgula/BelgeDogrulama.aspx?V=BE6P4U16H>

Fakülte Girişimsel Olmayan Etik Kurulu - Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dekanlığı, Korucuk Kampüsü, Korucuk, Adapazarı/Sakarya
Tel:264 295 6630 Faks:264 295 6629
E-Posta :tip@sakarya.edu.tr Elektronik Ağ :www.tip.sakarya.edu.tr



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Mehmet ÖLMEZ

Doğum yeri ve tarihi: Konya 06.08.1982

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu: Yapıldı

İletişim adresi ve telefonu: Serdivan/Sakarya +90 505 468 16 12

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

2016-2020 Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Uzmanlık eğitimi

2000-2007 Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi

1997-2000 Konya Özel Büyükkoyuncu Fen Lisesi

1993-1997 Konya Selçuklu Anadolu Lisesi

1989-1993 Konya Hazım Uluşahin İlkokulu

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

2007-2016 Dr.

2016- Araştırma Görevlisi Dr.

IV- Mesleki Deneyimi

2008 Devlet Hizmet Yükümlülüğü kapsamında Kastamonu Küre Merkez Sağlık
Ocağında pratisyen hekimlik

2008-2009 Kastamonu Doğanyurt 1 Nolu Aile Hekimliği Biriminde aile hekimliği

2009-2010 Kastamonu Tosya 7 Nolu Aile Hekimliği Biriminde aile hekimliği

2011-2013 Kastamonu Küre Toplum Sağlığı Merkezinde pratisyen hekimlik

2013-2014 Kastamonu Şenpazar 1 Nolu Aile Hekimliği Biriminde aile hekimliği

2014-2016 Kastamonu Tosya 3 Nolu Aile Hekimliği Biriminde aile hekimliği

2016-2020 Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
uzmanlık eğitimi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Deneysel, Biyoteknolojik, Klinik ve Stratejik Sağlık Araştırmaları Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayımları:

Makaleler

- 1- Yılmaz K, Demiray T, Ölmez M, Kılıç Ü, Köroğlu M, Altındış M. Nadir Bir Menenjit ve Beyin Absesi Etkeni Olarak *Streptococcus constellatus*. J Biotechnol and Strategic Health Res. 2017;1:31-33.
- 2- Ölmez M, Hatipoğlu H, Uzun C, Demiray T, Köroğlu M, Altındış M. Akciğer Kanseri Hastada Nadir Bir Bakteriyemi Etkeni; *Leclercia adecarboxylata*. J Biotechnol and Strategic Health Res. 2018;2(1):46-9.
- 3- Guclu E, Karabay O, Koroglu M, Simsek A, Olmez M, Altindis M, Ogutlu A. *Salmonella enteritidis* Besin Zehirlenmesi; Bir Üniversite Hastanesi Deneyimi. Mediterr J Infect Microb Antimicrob, 2018;7:Supplement 1:1-308.
- 4- Kilic U, Koroglu M, Olmez M, Altindis, M. Investigation of the In Vitro Effectiveness of Aztreonam/Avibactam, Colistin/Apramycin, and Meropenem/Apramycin Combinations Against Carbapenemase-Producing, Extensively Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. Microbial Drug Resistance, 2020.
- 5- Terzi HA, Aydemir O, Karakece E, Hatipoglu H, Olmez M, Koroglu M, Altindis M. Investigation of the rapid immunochromatographic test performance in the diagnosis of syphilis; comparison of four serological methods. Journal of Laboratory Medicine, 2020;44(4), 221-226.
- 6- Altindis M, Koroglu M, Demiray T, Yilmaz K, Baran Inci M, Olmez M, Erkorkmaz U. Microbial contamination and infection risks of narghile besides hazards of tobacco. Central European Journal of Public Health, 2020;28(1), 74-78.

Posterler

- 1- Terzi HA, Aydemir Ö, Karakeçe E, Köroğlu M, Ölmez M, Altındış M. Viral ensefalit/menenjit şüpheli hastaların beyin omurilik sıvısında

Herpes virüslerinin PCR ile saptanması. 32. ANKEM kongresi, 10-14 Mayıs 2017, Antalya, P-52.

2- Guclu E, Karabay O, Koroglu M, Simsek A, Olmez M, Altindis M, Ogutlu A. *Salmonella enteritidis* Besin Zehirlenmesi; Bir Üniversite Hastanesi Deneyimi. 7. Türkiye EKMUD Uluslararası Kongresi, 8-13 Mayıs 2018, Antalya, PS-253.

3- Aydemir Ö, Terzi HA, Karakeçe H, Hatipoğlu H, Ölmez M, Köroğlu M, Altındış M. Sifiliz tanısında kullanılan dört serolojik yöntemin karşılaştırması. XXXVIII. International Uluslararası Turkish Microbiology Congress, 4-8 Kasım 2018, Antalya, PS-109.

Olgu sunumu

1- Yılmaz K, Demiray T, Ölmez M, Kılıç Ü, Köroğlu M, Altındış M. Nadir Bir Menenjit ve Beyin Absesi Etkeni Olarak *Streptococcus constellatus*. J Biotechnol and Strategic Health Res. 2017;1:31-33.

2- Ölmez M, Hatipoğlu H, Uzun C, Demiray T, Köroğlu M, Altındış M. Akciğer Kanseri Hastada Nadir Bir Bakteriyemi Etkeni; *Leclercia adecarboxylata*. J Biotechnol and Strategic Health Res. 2018;2(1):46-9.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar:

Ödüller

Projeleri

Verdiği konferans ya da seminerler

Katıldığı paneller (panelist olarak)

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri

1- Anaerob bakteriyoloji kursu, İstanbul, Mayıs 2018

2- Gıda ve su kaynaklı enfeksiyon etkenleri uygulamalı eğitimi, Ankara, Eylül 2018

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

Diğer üyelikleri