

ANAEROP BAKTERİLERİN İDENTİFİKASYONUNDA SORUNLAR

Bengül DURMAZ

İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AB Dalı, Malatya

GİRİŞ

Son 20 yılda anaerop bakteriler önemli infeksiyon etkenleri olarak tanımlanmaktadır. Klinik örneklerin alınması, taşınması ve kültürü için anaerop atmosfer koşullarının gerekmesi, özel besiyerlerinin kullanılması gibi nedenlerle maliyetinin yüksek olması, bu konuda iyi yetişmiş laboratuvar personelinin yeterli sayıda olmaması, pek çok hastahane laboratuvarında anaerop kültür yapılmasını engellemektedir. Anaerop infeksiyonların uygun olmayan tanı ve tedavileri morbidite ve mortaliteyi önemli oranda etkilemektedir. Geniş spektrumlu ampirik antimikrobiyal tedavi pahalıdır, etkili olmayabilir ve ayrıca antimikrobiallere karşı direnç gelişimine de sebep olmaktadır. Ayrıca yanlış tanı sonucu yoğun bakımda kalınan her ilave gün milyonlarca liraya mal olmaktadır. Bilinen bu gerçeklere rağmen; anaerop kültürlerin gerçek değerini belirlemek zordur.

Anaerop infeksiyon etkenlerinin identifikasyonunda sorunlar

1. Anaerop infeksiyonlar karma infeksiyonlardır. Çok sayıda anaerop, fakültatif ve aerop bakteriler birlikte rol oynarlar.
2. Anaeroplara, sıklıkla normal floradan kaynaklanırlar. İzole edilen suşun floradan kaynaklanan bir kontaminant olup olmadığından emin olunmalıdır.
3. Örnek alınması ve taşınması sırasında hava ile karşılaşırse bakteri izole edilemeyebilir.
4. Anaerop bakteriler yavaş ürediğinden (fermentasyon yetersizliğine bağlı olarak) izolasyonu birkaç gün ya da daha uzun süre alır.
5. Bazı Gram pozitif anaeroplara, anaerop kabin dışında aerop koşullarda Gram yöntemi ile boyandıklarında, Gram negatif boyanma özelliği gösterirler. *Eubacterium plautii*, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium clostridioforme* Gram negatif boyandığında *Bacteroides* veya *Fusobacterium* türleri olarak yanlış tanımlanabilirler. *Peptostreptococcus asaccharolyticus* inkübasyonu 48 saate ulaşınca Gram negatif boyanma özelliği gösterir.
6. Geç ve güç üreyen, aerop koşullarda 48 saatte koloni oluşturabilen aerop ya da kapnofilik bakteriler, aerotolerans testi sonucu 48 saatte önce değerlendirilirse yanlışlıkla anaerop bakteri olarak tanımlanabilir.
7. Kullanılacak malzeme ücretlerinin fazla olması, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında detaylı ve pahalı identifikasyon protokollerinin uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Çabuk sonuç veren ticari identifikasyon sistemleri hem pahalıdır (çoğunlukla da yanlış sonuç verir) hem de tam identifikasyon için ilave olarak birçok testin (Gram boyası, katalaz ve ayırt edici, bazı biyokimyasal testler) yapılmasını gerektirir.
8. Anaerop kültür ve identifikasyonda sonucun kliniğe yararlı olabilmesi için, anaeroplara mikrobiyolojisi ve patojenitesi ile ilgili kli-

nisyenlerin devamlı eğitimi ve çok iyi bir klinik-laboratuvar ilişkisi gereklidir.

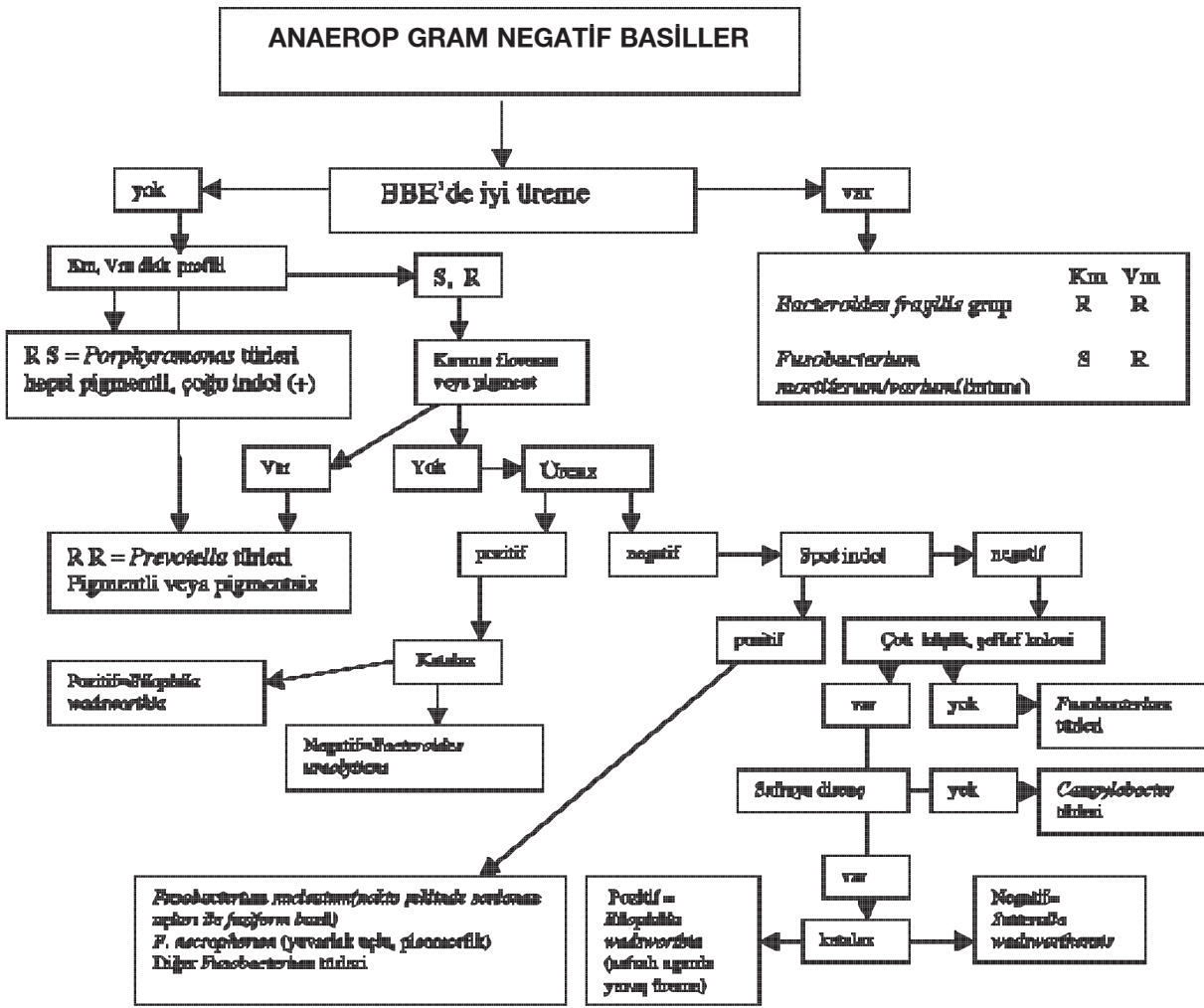
Anaerop bakteri identifikasyonunun ekonomik olması ve hızlı klinik yarar elde edilebilmesi için identifikasyon akış şemalarının uygulanması önerilmektedir (Şekil 1,2).

İdentifikasyon akış şemaları için, sınırlı sayıda ayıraç ve birkaç malzemeye gerek vardır. Bu şemalar, suşların büyük bir kısmını cins seviyesinde bazılarını da tür seviyesinde tanımlayabilir. Çalışma zamanı yönünden ticari identifikasyon sistemleri ile karşılaştırıldığında; tüm testler bir subkültürle yapılabildiği için çok fazla zaman farkı bulunmamaktadır. Ticari identifikasyon sistemleri yerine identifikasyon akış şeması kullanımı, sonuçların doğruluğunu ve zamanı etkilemeden, yılda 1569 dolar (toplam fiyatın %50'si) tasarruf sağlamaktadır. Üstelik identifikasyon akış şeması, konvansiyonel identifikasyon için kullanılan yöntemlerle (birçok vakada cins seviyesinde) karşılaştırıldığında %92 uyumlu bulunmuştur. Hatalı sonuç *Gemella* türleri, *Staphylococcus saccharolyticus* ve *Streptococcus intermedius* izolatları arasında görülmüştür. Bu türler identifikasyon akış şeması ile *Peptostreptococcus* türleri olarak tanımlanmıştır.

Klostridiumlar, Gram pozitif basiller ve kokların tanımlanmasında ticari sistem kullanılmadığında 725 dolar tasarruf sağlandığı bildirilmektedir. *B. fragilis* grup üyeleri, sadece özgül potensdeki identifikasyon diskler kullanılarak tanımlanır ve daha ileri identifikasyon yapılmazsa, bu suşlar için yıllık tahmin edilen identifikasyon fiyatı; 174 dolardan 56 dolara düşmektedir. Üstelik bu hesaplanan tasarruf, laboratuvar personelinin zamanını ve gereken kalite kontrol testlerini içermemektedir. Klinik olarak önemli tüm izolatların identifikasyonu için identifikasyon akış şemalarını kullanmak gerçek tasarruf sağlamaktadır.

Anaeroplara izolasyonu ve identifikasyonu, primer kültür plaklarında üremesine bağlıdır. Beş ya da daha fazla anaerop bakteri suşunun bir besiyerinde ürediği saptanırsa (böyle kültürlerde birçok fakültatif bakteride vardır); bu izolatların herbirini tek tek tanımlamanın klinisyene genellikle faydası yoktur. Karışık flora olarak rapor edilmez. Bir tip bakteri baskın bir şekilde üremişse; sadece bu izolat seçilerek tanımlanmalıdır. Böyle durumlarda, kısmi veya hızlı identifikasyon şeması kullanılmalı, klinik olarak önemli ve potansiyel olarak antibiyotiklere dirençli *Bacteroides fragilis* grup üyelerinden şüphelenilmelidir.

Kültürde ikiden daha fazla anaerop (veya toplam üç mikroorganizmadan daha fazla) varsa, kısmi identifikasyon yapılabilir. Kısmi identifikasyonda zorunlu anaerop olduğunu doğrulamak için bir subkültür yapılır. Sadece Gram boyama ile tanımlanır. Kültür ve mikroskoptaki morfolojisi cins olarak tanımlamaya yeterli ise; *Clostridium*, *Fusobacterium* gibi..., pigmentli ise; *Prevotella* veya *Porphyromonas* cins-



Şekil 1: Anaerop Gram negatif basillerin identifikasyonu için akış şeması.

BBE= Bacteroides Bile Esculin Agar; Km= Kanamisin; Vm= Vankomisin; R=Dirençli (inhibisyon zonu <10 mm); S= Duyarlı (inhibisyon zonu 10 mm)

lerine benziyor diye adlandırılabilir.

Tüm anaerop Gram negatif basiller için hızlı beta laktamaz (sefinaz) testi yapılabilir. Sonuç, beta laktamaz pozitif veya negatif Gram negatif anaerop basil şeklinde rapor edilebilir. Bu sınırlı bilgi bile, çoğul mikroorganizmaların etken olduğu karma infeksiyonların tedavisinde, klinisyenin bir strateji belirlemede faydalı olabilir.

Tam identifikasyonlar mümkün olduğu kadar hızlı ve kısaltılmış olmalıdır. *Clostridium perfringens* mikroskopik görünümü ve kanlı agarda koloniler etrafında çift hemoliz zonu oluşturması ve yumurta sarılı agarda lesitinaz üretimi ile tanımlanabilir.

B. fragilis grup, Bacteroides safra eskulin agar besiyerinde (BBE) tipik üremesi ve identifikasyon için olan kanamisin, vankomisin antibiyotik disklerine dirençli olması ve beta laktamaz üretimi ile tanımlanabilir.

Anaerop koklar, boyanma ve kültür özelliklerine göre cins seviyesinde ayırt edilebilirler. Anaerop koklar için antibiyotik disk uygulamasına gerek yoktur. Gram pozitif koklar *Peptostreptococcus*, Gram negatif koklar *Veillonella* olarak rapor edilebilir. Ancak saf kültür halinde üreyen veya göğüs apseleri ve derin yumuşak doku infeksiyonları gibi klinik olarak önemli infeksiyonlardan izole edilen anaerop Gram pozitif koklar bir ticari identifikasyon sistemi kullanılarak tür

seviyesinde tanımlanmalı ve duyarlılık testleri yapılmalıdır. Çünkü bu infeksiyonlarda en yaygın patojen olarak bulunan *Peptostreptococcus magnus* klindamisin ve diğer antibiyotiklere diğer *Peptostreptococcus* türlerinden daha dirençlidir.

İndol negatif, sporsuz, anaerop Gram pozitif basillerin Gram boya morfolojisi öğrenildikten sonra, orijinal anaerop kanlı agardan subkültür yapılırken nitrat diski yerleştirilerek ve katalaz aktivitesi bakılarak ön tanımlı yapılabilir (şekil 2).

Daha ileri ve zor yapılacak identifikasyonlar bir referans laboratuvarında ticari, biyokimyasal sistemler ve gaz-sıvı kromatografi kullanılarak yapılabilir.

Maliyet-yarar ilişkisi değerlendirildiğinde; anaerop bakteriyolojik örneklerin mümkün olduğu kadar etkin bir şekilde işlenmesi, seçici ve ayırt edici besiyerlerinin kullanılması gereklidir. Bunlar BBE, LKV (dondurulup çözülmüş kan ilaveli, kanamisin vankomisin agar) ve feniletill alkollü kanlı agardır. Bu besiyerlerinin kullanılması ile karma floradaki fakültatif bakterilerden anaeroplardan ayırt edilmesi sağlanır.

Primer inokulasyon için temel anaerop besiyerine ilaveten BBE agar seçici besiyeri olarak kullanılırsa, klinik örneklerde sıklıkla etken olan *Bacteroides fragilis* grup üyesi anaeroplardan BBE agardaki tipik morfolojisine göre hemen rapor edilebilir.

Seviye 2 laboratuvarları: Anaeroplara daha ileri seviyede gruplandırılması ve identifikasyonu için identifikasyon akış şemalarında bulunan testleri yapabilirler.

Örneğin: spot indol veya buyyon testi (Ehrlich ayırıcı ile), katalaz testi (%15 H₂O₂ ile), safra duyarlılığı (%20'lik safra besiyeri olarak BBE kullanılarak), nitrat redüksiyonu (nitrat diski ve ayıraçları ile), üreaz testi (üre diski veya buyyon ile) gibi.

Uzun dalga boylu UV ışık kaynağı (wood lambası) altında kırmızı floresan vermesi ile pigmentli basillerin erken tanısı yapılabilir. Aksi halde pigment oluşumu için uzun inkübasyon süresine gerek duyulur veya dondurulmuş çözülmüş kan kullanılan anaerop besiyeri ya da tavşan kanlı anaerop besiyeri kullanılmalıdır.

Seviye 3 laboratuvarları: Çeşitli teknikler kullanarak, izole edilmiş anaeroplara mümkün olduğu kadar doğru bir şekilde tam identifikasyonunu yapabilirler. Biyokimyasal maddeleri içeren, önceden indirgenmiş anaerop olarak sterilize edilmiş buyyon tüpleri (PRAS), küçültülmüş biyokimyasal sistemler (ör: API, BBL Crystal Anaerobe, Sceptor Anaerobe), hızlı enzim belirleme panelleri (ör: RapID ANAI, ANI Card-Vitek sistemi, Rapid ID 32A, API ZYM), enzim substratı taşıyan diskler (ROSCO tablet), metabolik son ürünleri tespit eden gaz-sıvı kromatografi, serbest yağ asidi, metil ester analizleri gibi pek çok pahalı ve iş yükü fazla testler, teknikler kullanılarak tam identifikasyon sağlanabilir.

Böylece referans laboratuvarında stoklanan identifikasyonu yapılmış anaerop bakterilerin bölge ya da ülke genelinde infeksiyonlardaki insidanslarını ve antibiyotiklere duyarlılık profillerini gösterecek çalışmalar için zemin hazırlanmış olur. Hem ekonomik hem de etkin bir klinik fayda sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Baron EJ, Citron DM. Anaerobic identification flowchart using minimal laboratory resources. *J Clin Microbiol* 1997; 25(suppl 2): S143-46.
2. Cavallaro JJ, Wiggs LS, Miller JM. Evaluation of the BBL Crystal Anaerobe Identification System. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (12): 3186-91.
3. Durmaz B, Jousimies-Somer HR, Finegold SM. Enzymatic profiles of *Prevotella*, *Porphyromonas* and *Bacteroides* Species obtained with the API ZYM System and Rosco Diagnostic Tablets. *Clin Infect Dis* 1995; 20 (suppl 2): S192-4.
4. Johnson MJ, Thatcher E, Cox ME. Techniques for controlling variability in Gram staining of obligate anaerobes. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (3): 755-58.
5. Jousimies-Somer HR, Summanen PH, Finegold SM. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other Anaerobic Gram-Negative Rods and Cocci. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. eds. *Manual of Clinical Microbiology*, Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1999: 690-711.
6. Rodloff AC, Hillier SL, Moncla BJ, Peptostreptococcus, *Propionibacterium*, *Lactobacilli*, *Actinomyces* and other Non-spore-forming anaerobe, Gram-positive bacteria. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. eds. *Manual of Clinical Microbiology*, Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999: 672-689.
7. Rosenblatt JE. Can we afford to do anaerobic cultures and identification? A positive point of view. *J Clin Microbiol*, 1997;25(suppl 2): S127-31.
8. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Strong CA, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth anaerobic bacteriology manual*. 5th ed. Star Publishing, 1993:49-110.