

ANAEROP BAKTERİLERDE DİRENCİN SAPTANMASINDA KARŞILAŞILAN GÜÇLÜKLER

Nezahat GÜRLER

İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AB Dalı, İstanbul

Önemli enfeksiyon etkenleri arasında yer alan anaerob bakterilerin izolasyon ve identifikasyonlarında olduğu gibi antimikrobik maddelere direncin araştırılmasında da 2000'li yıllarda hala sorunlar yaşanmaktadır. Bu konuda anaerob bakterilerin çoğunun besiyerlerinde aerob bakterilere oranla daha geç ve güç üremeleri en önemli etmendir. Aerob bakterilerin duyarlılık deneylerinde rutin olarak kullanılan disk difüzyon deneyi gibi pratik, kolay ve ekonomik bir yöntem ne yazık ki anaerob bakteriler için kullanılamamaktadır. Anaerob bakterilerin antimikrobik maddelere duyarlılık ve direncinin belirlenmesinde ise hala bazı soruların cevabı kesinlik kazanmamıştır. En önemlisi "Anaerob bakteriler için duyarlılık deneyleri yapılmalı mıdır?" sorusudur. Bugün hala birçok merkezde bu konu tartışılmaktadır. Anaerob bakterilerin üremeleri için daha fazla zamana ihtiyaç duymaları sonuçların gecikmesine yol açmaktadır. İzolasyon ve duyarlılık deneyleri için gerekli sürenin uzun olması duyarlılık deneyi yapılıp yapılmaması konusundaki tereddütleri arttırmaktadır.

Antibiyotik duyarlılık deneyleri yapılmasındaki güçlükler şunlardır:

- Standardizasyonun sağlanamaması
- Breakpoint'in seçimi ve breakpoint ile MIC değerlerinin yakın olması
- Son yıllarda tanımlanan izolatlara ilişkin verilerin azlığı
- Az sayıda cinsin denenmesi
- Seçilen türün diğer türleri temsil etmemesi
- Klinik laboratuvar işbirliğinin yetersiz olması.

Yukarıda sayılan bu güçlüklerin yanısıra anaerob bakterilerin antimikrobik maddelere duyarlıklarının belirlenmesinde laboratuvarla ilgili sorunlar da vardır. Laboratuvarında farklı yöntemlerin kullanılması sonuçların farklı olmasına neden olmaktadır. Duyarlılık deneyi yapılacak suşun tanısının doğru yapılması gerekmektedir. Aerob, mikroaerofil ve kapnofilik bir bakterinin bazı antimikrobiklere duyarlılığı anaerob bakterilerden farklı olabilir. Örneğin nitroimidazol türevleri anaerob bakterilerin büyük bir çoğunluğuna etkili olduğu halde aerob ve diğer bakterilere etkisizdir. Bu nedenle zorunlu anaerob olmayan bir bakteri bu antimikrobiğe yanlış olarak dirençli bildirilebilir. Duyarlılık deney sonuçları farklı merkezlerde değişik şekillerde bildirilmektedir. MIC₅₀, MIC₉₀ değerlerinin verilmesi bazan yanıltıcı olabilmektedir.

Anaerob bakterilerde yukarıda sayılan yöntemle ilgili olumsuzlukların yanısıra aerob bakterilerin tersine olarak bazı antimikrobik maddelere direnç gelişimi, ya hiç yok veya çok düşük orandadır. Bu nedendirki aerob enfeksiyon düşünüldüğünde tedavi çoğu kez ampirik olmaktadır. Karbapenemler, nitroimidazoller ve betalaktamaz inhibitörlü antibiyotikler anaerob bakterilere iyi etkili antimikrobiklerdir. Aminoglikozitler trimetoprim-sulfametoksazol, 1. generasyon kinolonlar ve monobaktamlar ise anaerob bakterilere etkisizdir.

Anaerob bakterilere iyi etkili olduğu hatta hiç direnç bildirilmeyen antimikrobiklere son yıllarda bazı ülkelerden direnç bildirilmeye baş-

lanmıştır. Ve bu dirençli suşlarda artış gözlenmektedir. Özellikle *Bacteroides fragilis* gurubunda bulunan mikroorganizmalarda antimikrobik maddelere direnç daha fazla gözlenmektedir. *Bacteroides fragilis* gurubunda bakterinin oluşturduğu beta laktamaz direnç gelişiminde ön plandadır. Direnç gelişimiyle ilgili başka mekanizmalarda bulunmaktadır.

Tablo: *Bacteroides* cinsinde saptanan direnç mekanizmaları

- Beta-laktamazlar
- Sefoksitin ve imipenemi inaktive eden enzimler
- Nitroredüktaz ve asetiltransferaz enzimleriyle kloramfenikolün inaktivasyonu
- Penisilin bağlayan proteinlerin (PBP-1, PBP-2) afinitesinde değişiklik
- Klindamisin için hedef bölgede değişim (muhtemelen RNA metilazla)
- Tetrasiklinlerin hücre içine alınımının azalması
- Metronidazolün redüksiyonunun azalması

Günümüzde daha seyrek olarak *Prevotella*, *Porphyromonas* cinsleri ve bazı *Fusobacterium* cinslerinde de beta laktamaz oluşumuna rastlanmaktadır. Anaerob bakterilerde de antimikrobik maddelere direncin artış göstermesi ve klinik örneklerden izole edilen direncin daha çok beklendiği anaerob bakterilerin duyarlılık deneylerinin yapılması gerekliliğini düşündürmektedir.

Gelişmiş ülkelerdeki laboratuvarların bir çoğunda rutin duyarlılık deneyleri yapılmayıp ancak özel durumlarda yapılmaktadır. Anaerob bakterilere iyi etkili ve direnç gelişiminin gözlenmediği veya çok düşük oranda rastlandığı bazı antimikrobik maddelerin mevcut olması duyarlılık deneylerinin uygulama ve değerlendirilmesindeki güçlükler duyarlılık deneyinin rutin yapılmaması düşüncesini desteklemektedir.

Anaerob bakterilerde duyarlılık deneyleri ile ilgili olarak bazı soruların yanıtlarını irdelemek yararlı olacaktır.

- Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında rutin olarak anaerob bakterilerin duyarlılık deneyi yapılmalıdır?
- Hangi suşlar için duyarlılık deneyi yapılmalıdır?
- Hangi antimikrobik maddeler denenmelidir?
- Hangi yöntem uygulanmalıdır?

Anaerob bakterilerde antimikrobik maddelere direnç sadece *Bacteroides fragilis*

gurubunda olmayıp diğer anaerob bakterilerde de gözlenmektedir. *Bacteroides gracilis*, *C. Ramosum* ve *Fusobacterium varium* dirençli olan bakterilerin başında gelmektedir. Anaerob bakterilerin antimikrobik maddelere duyarlılık ve dirençlerinin saptanması her merkezde rutin olarak değil zaman zaman araştırılarak her merkezin kendine am-

pirik tedavide yol gösterici verilerini elde etmesi daha uygun görünmektedir.

NCCLS anaerob bakterilerin duyarlık deneylerinin belirli durumlarda yapılmasını önermektedir.

- Anaerob bakterilere yeni antimikrobiklerin etkinliğinin saptanmasında
- Çeşitli merkez ve hastanelerde duyarlık deneylerinin periyodik olarak yapılarak direnç paternlerinin belirlenmesinde
- Özel hastalardaki ciddi infeksiyonların tedavisine yardımcı olmak amacıyla duyarlık deneyi yapılmasının uygun olacağı bildirilmektedir.

NCCLS Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında hastalardan izole edilen birçok anaerob bakteri için duyarlık deneyi yapılmasının gereksiz olduğunu belirtmektedir. Duyarlık deneyleri;

- Dirençli olduğu bilinen bir bakteri izole edildiğinde,
- Uygulanan tedavi protokolündeki başarısızlık ve infeksiyonun inatla devam ettiği durumlarda
- Antimikrobiyal maddelere izole edilen suşların direnç gelişiminin araştırılmasında
- Ampirik tedavi bulunmadığında
- Ciddi infeksiyonlarda
- Uzun süreli tedavi gerektiğinde yapılmalıdır.

Anaerob bakterilerin rutin duyarlık deneylerinin birçok merkezde yapılmaması görüşü ağırlık kazanmakla birlikte bazı infeksiyonlarda duyarlık deneylerinin yapılması NCCLS tarafından da önerilmektedir.

Bunlar;

- Beyin absesi
- Endokardit
- Prostetik alet ve vasküler greft infeksiyonları
- Eklem infeksiyonları
- Osteomyelit
- Tekrarlayan bakteriyemilerdir.

NCCLS çalışma gurubu virulansı daha fazla ve genellikle antimikrobik maddelere dirençli bazı anaerob bakterilerin duyarlık deneyi yapılmasını tavsiye etmektedir. Bu mikroorganizmalar;

- *B.fragilis* gurubunda bulunan mikroorganizmalar
- Diğer *Bacteroides* türleri (*B.gracilis* gibi)
- *Porphyromonas* ve *Prevotella* spp.
- *C.perfringens*
- *C.ramosum*
- *C.septicum*
- Bazı *Fusobacterium* spp. (*F.varium* gibi)
- *Bilophila wadsworthia*

Anaerob bakterilerin duyarlık yapıp yapılmaması konusundaki sorunların bir başka

yönü de duyarlık deneylerinin değerlendirilmeleri ve hangi yöntemin uygulanacağı konusundadır. Duyarlık deneyleri için "altın standart" olarak kabul edilecek bir teknik bulunmamaktadır. Kullanılabilen tüm yöntemlerle ilgili olara birtakım güçlükler bulunmaktadır. Anaerob bakterilerin izolasyonlarının güçlüğü, besiyerlerinde geç üremeleri, bazı yöntemlerle "endpoint" lerinin okunma güçlükleri yöntemlerin birbirleriyle kıyaslanamamaları, sonuçlarının uygunluk göstermemeleri karşılaşılan önemli problemlerdir.

Kullanılan yöntemlerin invivo yahut klinik durumla ilişkisinde sorunlar bulunmaktadır. Anaerob bakterilerin duyarlık deneyi yapılacaksa NCCLS'in önerdiği referans yöntem agar dilüsyon yöntemidir ve *Brucella* agar tavsiye edilmektedir. Fakat agar dilüsyon yönteminin

Klinik Mikrobiyoloji Labotratuvarında rutin uygulanması pratik değildir. Buyyoda dilüsyon yöntemleri hem makro hem de mikro dilüsyon kullanılabilir. Buyyonda dilüsyon yöntemi için hemin, sodyumbikarbonat ve vitamin K ilave edilmiş *Brucella* buyyon besiyeri kullanılmasının uygun olacağı belirtilmektedir. Makro dilüsyon yönteminin mikro dilüsyona oranla daha güvenilir olduğu bildirilmekle birlikte pratik değildir. Ticari olarak hazırlanmış mikropaklarla anaerob bakterilerin duyarlık deneyleri yapılabilmektedir ancak bu mikropakların kullanılmasının pigmentli anaeroplarda sorun yaratabileceği unutulmamalıdır.

Bu yöntemlerin dışında Spiral-Gradient-End point (SGE) ve PDM Epsilonometre (E test) anaerob bakterilerin duyarlık deneyi için alternatif olarak düşünülebilir.

Aerob bakteriler için kullandığımız disk diffüzyon yöntemi ve buyyonda disk yöntemi anaerob bakterilerin duyarlıkları için kullanılmaması gereken yöntemlerdir.

NCCLS tarafından önerilen duyarlık deneylerinde mutlaka kontrol suşları kullanılmalıdır.

Bu suşlar;

- *B.fragilis* (ATCC 25285)
- *B.thetaiotaomicron* (ATCC 29741)
- *E.lentum* (ATCC 43055)

Sonuç olarak Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında anaerob bakterilerin antimikrobik

maddelere dirençlerinin araştırılması için NCCLS'in tavsiye ettiği yöntemler kullanılmalıdır.

Ticari olarak hazırlanmış mikro yöntemler dikkatli kullanılmalı mutlaka standart suşlarla kontrollü çalışılmalıdır. Rutin olarak ancak belli bakteriler için duyarlık deneyi yapılmalıdır. E test özellikle çabuk üreyen anaerob bakteriler için uygun bir yöntemdir. Fakat çok pahalı olduğundan akılcı bir şekilde kullanılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Dougherty SH:**Antimicrobial culture and susceptibility testing has little value for routine management of secondary bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 25 (suppl 2):S258 (1997).
2. **Duerden BI:** Role of the reference laboratory in susceptibility testing of anaerobes and a survey of isolates referred from laboratories in England and Wales during 1993-1994. *Clin Infect Dis* 20 S180 (1995).
3. **Engelkirk PG, Engelkirk-Duben S:** Anaerobes of Clinical Importance," *CR Mahon, G Manuselis (eds): Diagnostic Microbiology " 2.baskı kitabında s.565, W.B Saunders Co, Philadelphia (2000).*
4. **Finegold SM, NCCLS Working Group on Anaerobic Susceptibility Testing:** Susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 26:1253(1998).
5. **Finegold SM:** Mechanisms of resistance in anaerobes and new development in testing. *Diag Microbiol Infect Dis* 12:117S (1989).
6. **Finegold SM:** Anaerobic Gram- negatif rods: *Bacteroides, Prevotella, Porphyromonas, Fusobacterium, Bilophila* , "SL Gorbach, JG Bartlett, NR Blacklow (eds): *Infectious Diseases*" p.1571, WB Saunders Co Harcourt Brace Jovanovich (1992).
7. **Finegold SM:** Anaerobic Infections in humans : An overview. *Anaerob* 1:3 (1995).
8. **Finegold SM:** Anaerobic bacteria: General concepts," *GL Mandel, JE Bennett, R Dolin (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 4th Ed.* p.2156 Churchill Livingstone, New York (1995).
9. **Finegold SM:** Perspective on susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* 25(Suppl 2):S251 (1997).
10. **Finegold SM:** Anaerobic Bacteria: General Concepts," *GL Mandel, JE Bennett, R Dolin (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases*" 5.baskı, ch.233, s-2519-2542, Churchill Livingstone, Philadelphia (2000).

11. **Gürler N:** Anaerop bakterilerin duyarlık deneyleri, *ANKEM Derg.* 10(2):229 (1996).
12. **Gürler N:** Antibiyotik duyarlık testlerinde sorunlar: Anaerop mikroorganizmalar, *Antibiyotik Duyarlık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı, Toplantı Kitabı* s.65, 11-12 Nisan 1997, İstanbul.
13. **Gürler N:** Anaerop bakterilerde kısıtlı antibiyogram, 4. *Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler, Program ve Özet kitapçığı*, s.126, 17-19 Mayıs 1999.
14. **Gürler N:** Anaerop İnfeksiyonlara Genel Bakış ve Antimikrobiyallere Direnç Durumu, *ANKEM Derg.* 15 (3):593 (2001).
15. **Hecht DW, Lederer L:** Effect of choice of medium on the results of in vitro susceptibility testing of eight antibiotics against the *Bacteroides fragilis* Group. *Clin Infect Dis* 20:S346 (1995).
16. **Hecht DW, Lederer L, Osmolski JR:** Susceptibility results for the *Bacteroides fragilis* Group: Comparison of the broth microdilution and agar dilution methods. *Clin Infect Dis* 20:S342 (1995).
17. **Isenberg HD:** Essential Procedures for Clinical Microbiology, ASM Press, Washington, D.C (1998).
18. **Johnson MJ, Thatcher E, Cox ME:** Antimicrobial susceptibility tests for anaerobic bacteria with use of disk diffusion method. *Clin Infect Dis* 20:S334 (1995).
19. **Koneman EW, Allen SP, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC:** Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 4th Ed, JB Lippincott, Philadelphia (1992).
20. **National Committee for Clinical Laboratory Standards:** Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria 4th Ed, Approved Standard M11-A3, Vol 13, No.26, Villanova (1997).
21. **Nord CE:** Beta lactam resistance in *Provetella*, *Porphyromonas* and *Fusobacterium*-species. (Abstract Book.p.225). 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna March 26-30 (1995).
22. **Peleaz MT, Rando C, Conde P, Coque T, Rodriguez Creixems M, Cercenado E:** Incidence of metronidazol resistance in *Bacteroides fragilis* group (BEG). 17th International Congress of Chemotherapy Abstract No.1014, Berlin, June 23-28 (1991).
23. **Rosenblatt JE:** Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic Bacteria." V Lorian (ed): Antibiotics in laboratory Medicine", 4th Ed. P.112 Williams-Wilkins, Baltimore (1996).
24. **Rosenblatt JE, Gustafson DR:** Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diag Microbiol Infect Dis* 22 :279 (1995).
25. **Schieven BC, Massey VE, Lannigan R, Hussain Z:** Evaluation of susceptibility of anaerobic organisms by the E test and reference agar dilution method. *Clin Infect Dis* 20:S337 (1995).
26. **Wexler HB:** Susceptibility testing of anaerobic bacteria: Myth, Magic or Method, *Clin Microbiol Rev* 4:470 (1991).
27. **Wexler HM, Doern GV:** Susceptibility testing of anaerobic bacteria. "PR Murray, EJ Baron, MA Pfaller FC Tenover, RN Tenover (eds): Manual of Clinical Microbiology 6th Ed .p.1350, ASM Press, Washington (1995).
28. **Wexler MH, Molitoris E, Molitoris D:** Susceptibility testing of anaerobes : old problems, new options ? *Clin Infect Dis* 25 (Suppl 2) S275 (1997).