



SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE SAğLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

***BACTEROIDES* TÜRLERİNDE**
ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIğIN
AKIM SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE HIZLI TESPİTİ

Biyolog Sinem KAYA

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Orhan BEDİR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ARALIK/2018

TEZ KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalında/Programında Sinem Kaya tarafından hazırlanan "Bacteroides Türlerinde Antimikrobiyal Duyarlılığın Akım Sitometri Yöntemi ile Hızlı Tespiti" başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Mehmet BAYSALLR

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Bu Tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum Üye:

Prof.Dr. Fatma Ferda TUNÇKANAT

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Bu Tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum Üye:

Prof.Dr. Bengül DURMAZ

Yüksek İhtisas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Bu Tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum Üye:

Prof.Dr. Ali ALBAY

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Bu Tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum Üye:

Danışman: Doç.Dr. Orhan BEDİR

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

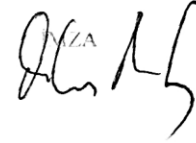
Bu Tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum Üye:


İMZA


İMZA


İMZA

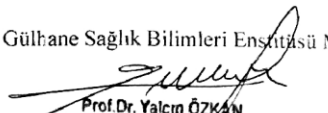

İMZA


İMZA

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 22 KASIM 2018

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü


Prof.Dr. Yalçın ÖZKAN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Müdür Yardımcısı

GSBE/SBE Form No:2018/32

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza :

Adı Soyadı : Sinem KAYA

Tez Savunma Tarihi : 22 Kasım 2018

ÖZET

***Bacteroides* Türlerinde Antimikrobiyal Duyarlılığın Akım Sitometri Yöntemi İle Hızlı Tespiti**

Anaerop bakteriler, yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan bakterilerdir. Anaerop bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar çoğunlukla endojen kaynaklıdır ve miks enfeksiyonlar şeklinde seyretmektedir. Önemli enfeksiyonlara neden olan anaerop bakterilerde direnç sorunu her geçen gün artmaktadır. Artan direnç sorunu ile, bölgesel olarak bu bakterilerin duyarlılık/direnç profillerinin belirli periyotlar halinde belirlenmesi daha da önem kazanmaktadır. Anaerop bakterilerin duyarlılık test yöntemleri, uygulanması pratik olmayan, zaman alıcı yöntemlerdir ve rutin olarak uygulanmamaktadır. Ancak steril bölgelerden ve tek etken olarak izole edildiğinde, *Bacteroides fragilis* gibi yüksek virülansa sahip olan dirençli türlerde, ampirik tedaviye rağmen iyileşmeyen olgularda duyarlılık test yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir.

Çalışmada; *Bacteroides* türlerinde antimikrobiyal duyarlılığın tespit edilmesinde, akım sitometri yönteminin uygulanabilir bir yöntem olup olmadığı araştırılmıştır. Bunun için Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'na rutin anaerop kültür isteğiyle gönderilen örneklerden izole edilen *Bacteroides* türleri kullanıldı. İzole edilen bakterilerin tanımlanması Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ile yapıldı. Bakterilerin penisilin G, klindamisin, kloramfenikol, meropenem, metronidazol ve amoksisilin klavulanik asit antibiyotiklerine karşı olan antimikrobiyal duyarlılıkları referans yöntem agar dilüsyon yöntemi ile belirlendi. Çalışmada ayrıca E-Test yöntemi kullanıldı.

Akım sitometri analizinde, kullanılan antibiyotiklerin EUCAST'de belirtilen klinik sınır değer konsantrasyonları kullanıldı. Bu konsantrasyondaki antibiyotiklerle muamele edilen anaerop bakterilerde canlı/ölü hücre ayrımı yapıldı. Canlı/ölü hücre ayrımı için hücre geçirgen olan thiazole orange (TO) ve hücre geçirgen olmayan propidium iodide (PI) boyası kullanıldı.

Agar dilüsyon yöntemine göre duyarlı tespit edilen bakteriler 'hücre membran potansiyeli değişen hücreler', dirençli tespit edilen bakteriler ise 'hücre

membran potansiyeli değişmeyen hücreler' olarak değerlendirildi. Akım sitometri uygulamalarında antibiyotiksiz hücre süspansiyonlarının, negatif kontrol grubu olarak analizi yapıldı. Membran potansiyeli değişmeyen negatif kontrol grubu istatistiksel analize dahil edildi.

Bacteroides türlerinde antimikrobiyal duyarlılığa karar vermede 'Klinik Sınır Değer PI Boyanma Oranı (%)' kullanıldı. Klinik sınır değer hesaplanmasında Receiver Operating Characteristic (ROC) analizi yapıldı.

Çalışmada yer alan 6 antibiyotik için ortak 'Klinik Sınır Değer PI Boyanma Oranı (%)', %95 güven aralığında, %100 duyarlılık ve %100 özgülükte %30,86 olarak bulundu. %30,86'nın altında kalan PI boyanma oranlarına göre, bakteriler çalışmada yer alan tüm antimikrobiyallere karşı dirençli kabul edilirken, bu oranın üstünde kalan PI boyanmalarına göre duyarlı kabul edildi. Bu klinik sınır değer %95 güven aralığında, %100 duyarlılık ve %100 özgülükte meropenem için %26,7, amoksisilin-klavulanik asit için %35,55, klindamisin için %30,24, çalışmada kullanılan bakterisidal etki gösteren tüm antimikrobiyaller için %31,80, bakteristatik etki gösteren tüm antimikrobiyaller için ise %25,71 olarak bulundu.

Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar arasında kategorik uyum değerlendirmesi yapıldı. Akım sitometri yöntemi ile yapılan duyarlılık çalışmasında 'çok büyük hata' ve 'büyük hata' tespit edilmedi. İzolat sayısının sınırlı olması, duyarlılık sonucu 'klinik sınır değer'de saptanan suş ve 'orta duyarlı' klinik izolat olmaması nedeni ile 'minör hata' değerlendirilmesi yapılamadı. Akım sitometri yöntemi ile elde edilen sonuçlar referans yöntem ile uyumlu bulundu.

Sonuç olarak, akım sitometri yönteminde hücre geçirgen ve hücre geçirgen olmayan floresan boyaların bir arada kullanılmasıyla *Bacteroides* türlerinin antimikrobiyal duyarlılığı 1 saat gibi kısa bir sürede tespit edilebilmiştir. Bu çalışma ile, *Bacteroides* türlerinin antimikrobiyal duyarlılığın tespitinde, akım sitometri yönteminin oldukça hızlı ve güvenilir sonuçlar verdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Akım sitometri, antimikrobiyal duyarlılık, *Bacteroides*

ABSTRACT

Rapid detection of the antimicrobial susceptibility of *Bacteroides* spp. by flow cytometry

The infections caused by anaerobic bacteria have high morbidity and mortality rates. These infections are mostly endogenous and manifest as mixed infections. Antimicrobial resistance issue observed among anaerobic bacteria is steadily increasing. Due to this increase in resistance pattern, it is becoming more important to identify the susceptibility/resistance profiles of these bacteria periodically in certain periods. The methods of susceptibility testing of anaerobic bacteria are non-practical, time-consuming methods, and cannot be routinely applied. However, when isolated from sterile areas and as a single pathogen, for the resistant strains with high virulence like *Bacteroides fragilis* and in patients who do not recover despite empirical treatment, susceptibility testing methods need to be administered.

In this study, it has been investigated that if flow cytometry method is an applicable method for determination of antimicrobial susceptibility in *Bacteroides* spp. or not. For this purpose, *Bacteroides* species isolated from the samples sent for routine anaerobic culture to the Bacteriology Laboratory of Gülhane Training and Research Hospital were used. The isolated bacteria were identified by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). The antimicrobial susceptibilities of the isolated bacteria against penicillin G, clindamycin, chloramphenicol, meropenem, metronidazole, and amoxicillin clavulanic acid were determined by the reference method, agar dilution method. E-Test method was also used in the study.

In flow cytometry analysis, the clinical breakpoint concentrations of the antibiotics were used as defined in EUCAST. Live/dead cell differentiation was performed in anaerobic bacteria exposed to these antibiotics at these concentrations. The cell-permeable thiazole orange and cell impermeable propidium iodide stains were used for the live/dead cell differentiation.

While the anaerobic bacteria which were found to be susceptible by the agar dilution method were evaluated as “cells with changing membrane potentials”,

the bacteria found to be resistant were evaluated as “cells without changing membrane potentials”. In flow cytometry applications, the cell suspension without antibiotics was analyzed as negative control group. The negative control group with unchanged membrane potentials was included in the statistical analysis.

The clinical breakpoint value of PI staining rate (%) was used to determine the antimicrobial susceptibility in *Bacteroides* species. The Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis was performed for the calculation of the clinical breakpoint.

The common clinical breakpoint value of PI staining rate for the six antibiotics included in the study was found to be 30.86%, at the 95% confidence interval, with 100% sensitivity and specificity both. While the bacteria with PI staining rates below 30.86% were considered resistant to all antimicrobials involved in the study, the bacteria with PI staining rates above this threshold were considered as susceptible. In this study, clinical breakpoint was found to be 26.7% for meropenem, 35.55% for amoxicillin-clavulanic acid, 30.24% for clindamycin, 31.80% for all antimicrobials presenting bactericidal activity, and 25.71% for all antimicrobials presenting bacteriostatic effect. All values were at 95% confidence interval with 100% sensitivity and 100% specificity.

The categorical correlation was applied to the results obtained by both methods. In this study, “very major errors” and “major errors” were not detected by flow cytometry method. The “minor error” evaluation could not be made due to the lack of “intermediate susceptible” and “at the clinical breakpoint susceptible” clinical isolates and limited number of total isolates. The results obtained by flow cytometry were found compatible with those of the reference method.

In conclusion, the antimicrobial susceptibility of *Bacteroides* spp. was able to be detected in a relatively short period of time, one hour, by using a combination of cell permeable and non-cell permeable fluorescent dyes by the flow cytometry method. By this study, it was shown that the flow cytometry method provides fast and reliable results in determining the antimicrobial susceptibility of *Bacteroides* spp.

Keywords: Antimicrobial susceptibility, *Bacteroides*, flow cytometer.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırma Etik Kurulu'ndan alınan 12.04.2017 tarih ve 2012- KAEK-15/1385 sayılı onay ile Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır (Bkz.EK 1).

Çalışmamda bana her türlü desteği sağlayan başta Anabilim Dalı Başkanı'mız Prof. Dr. Mehmet BAYSALLAR ve değerli öğretim üyemiz Prof. Dr. Ali ALBAY'a, Prof. Dr. Şinasi Taner YILDIRAN'a ve eğitimim süresince bilgi ve becerimin artmasında çok değerli katkıları olan tez danışmanım Doç. Dr. Orhan BEDİR'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden her zaman faydalandığım, yetişmemde katkıları olan tüm değerli öğretim üyelerimize, çalışmam süresince bana destek olan Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji'de görev alan tüm biyolog, teknisyen, laborant arkadaşlarıma, tezimin akım sitometri çalışmalarında yardımlarını benden esirgemeyen Biyolog Sema ÖREN'e, istatistiksel analizlerde yardımları olan Volkan TÜRKMEN'e, bugünlere gelmemi sağlayan başta babam olmak üzere tüm aileme, bu süreçte bana hep sabırla yaklaşan eşim Harun KAYA'ya ve kızım Gülce KAYA'ya sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR	xiii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	18
BULGULAR	34
TARTIŞMA	54
SONUÇLAR.....	62
KAYNAKLAR	63
EKLER	69
ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ	72

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1 Normal florada bulunan anaerop-aerop bakteri oranları
- Tablo 2 Anaerop enfeksiyonlarda test edilen ve raporlanan antibiyotikler
- Tablo 3 Mikrobiyolojide akım sitometri uygulamalarında kullanılan floresan boyalar
- Tablo 4 Mikrobiyolojide akım sitometri yöntemi ile yapılabilen analizler
- Tablo 5 Çalışmaya dahil edilen örnekler
- Tablo 6 Antibiyotik tozları için kullanılan çözücü ve sulandırıcılar
- Tablo 7 Kullanılan antibiyotiklerin klinik sınır değerleri (EUCAST)
- Tablo 8 *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, meropenemin seri dilüsyonları ile 1, 2, 3 ve 4 saatlik inkübasyon sonundaki PI boyanma oranları (%)
- Tablo 9 *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, klindamisinini seri dilüsyonları ile 1, 2, 3 ve 4 saatlik inkübasyon sonundaki PI boyanma oranları (%)
- Tablo 10 Akım sitometri analizi için bakteri hücrelerinin hazırlanması
- Tablo 11 Hücrelerin TO ve PI bağlanma oranları (%)
- Tablo 12 İstatistiksel analize dahil edilen hücreler
- Tablo 13 Antimikrobiyaller için hesaplanan farklı duyarlılık ve özgüllükte klinik sınır değerleri
- Tablo 14 Çalışmaya dahil edilen bakteriler ve örneklerin klinik dağılımı
- Tablo 15 *Bacteroides* türlerinin agar dilüsyon duyarlılık test sonuçları
- Tablo 16 *Bacteroides* türlerinin E test duyarlılık test sonuçları
- Tablo 17 *B. fragilis* ATCC 25285, meropenem ve klindamisinini seri dilüsyonları ile 1 saat muamele sonrası TO (%) ve PI (%) ile boyanma oranları
- Tablo 18 Akım sitometri analizi ile *Bacteroides* türlerinde antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde kullanılan antibiyotik konsantrasyonları ve TO (%) ve PI (%) ile boyanma oranları
- Tablo 19 ROC analizine göre farklı duyarlılık ve özgüllükte hesaplanan farklı 'klinik sınır değer PI boyanma oranları (%)'
- Tablo 20 ROC analizi ile meropenem, amoksisilin-klavulanik asit ve klindamisin için farklı duyarlılık ve özgüllükte hesaplanan 'Klinik Sınır Değer PI Bağlanma Oranları (%)'

Tablo 21 ROC analizi ile bakterisidaller ve bakteriostatikler için farklı duyarlılık ve özgülükte hesaplanan 'Klinik Sınır Değer PI Boyanma Oranları (%)



ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1 Agar dilüsyon üreme kontrolü
- Şekil 2 E test yöntemi ile *Bacteroides* türlerinde antimikrobiyal duyarlılığın tespiti
- Şekil 3 Antibiyotiksiz TO ve PI ile boyanmış *B. fragilis* ATCC 25285
- Şekil 4 Isı etkisi ile hücre duvarı parçalanarak TO ve PI ile boyanmış *B. fragilis* ATCC 25285
- Şekil 5 Antibiyotiksiz boyanmamış hücre popülasyonu
- Şekil 6 Meropenem dirençli *B. fragilis*
- Şekil 7 Meropenem dirençli *B. fragilis*
- Şekil 8 *B. fragilis* ATCC 25285, antibiyotiklerin klinik sınır değerleri ile muamele sonrası TO ve PI boyanma oranları (%)
- Şekil 9 *B. fragilis* ATCC 25285, meropenem seri dilüsyonları ile yapılan akım sitometri analizi ve TO-PI boyanma oranları (%)
- Şekil 10 *B. fragilis* ATCC 25285, klindamisin seri dilüsyonları ile yapılan akım sitometri analizi ve TO-PI boyanma oranları (%)
- Şekil 11 Meropenem dirençli *B. fragilis* izolatlarının akım sitometri ile TO (%) ve PI (%) boyanma görüntüleri
- Şekil 12 Penisilin dirençli *B. fragilis*, beklenmeyen yüksek PI bağlanması
- Şekil 13 Metronidazol duyarlı *B. fragilis*, beklenmeyen düşük PI bağlanması
- Şekil 14 Agar dilüsyon sonuçlarına göre dirençli ve duyarlı bakterilerin PI boyanma oranlarına göre elde edilen ROC eğrisi
- Şekil 15 Çalışmadaki her bir antibiyotik (meropenem, amoksisilin-klavulanik asit ve klindamisin) için elde edilen ROC eğrisi (PI boyanma oranına göre)
- Şekil 16 Antibiyotik grupları (bakterisidaller ve bakteriostatikler) için elde edilen ROC eğrisi (PI boyanmasına göre)

SİMGE VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AMC	: Amoksisilin-Klavulanik Asit
ATCC	: American Type Culture Collection
AUC	: Area Under Curve
Bkz.	: Bakınız
BSAC	: British Society for Antimicrobial Chemotherapy
C	: Kloramfenikol
CFU	: Colony Forming Unit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DA	: Klindamisin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FSC	: Forward Scatter Chanel
MAC	: Minimum Antibacterial Concentration
MALDI-TOF MS	: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
MBK	: Minimum Bacterisidal Konsantrasyon
MEM	: Meropenem
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MT	: Metronidazol
OD	: Optik Dansitometre
PG	: Penisilin G
PI	: Propidium Iodide
ROC	: Receiver Operating Characteristic
SSC	: Side Scatter Chanel
TO	: Thiazole Orange

GİRİŞ VE AMAÇ

Önemli enfeksiyonlara neden olan anaerob bakterilerde direnç sorunu giderek artmaktadır. Anaerob bakterilerde duyarlılık testleri rutin olarak uygulanmamaktadır, ancak uygulama ile ilgili endikasyonların iyi bilinmesi önemlidir. Belirli merkezlerde/bölgelerde anaerob bakterilere karşı artmakta olan antimikrobiyal direncin periyodik olarak saptanarak izlenmesi, ampirik tedavi seçimi açısından önemlidir. Ayrıca ortaya çıkan yeni direnç sorunlarına ilişkin farkındalık, tedavinin yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Anaerob bakterilerde duyarlılık test yöntemleri, maliyetli, zahmetli ve zaman alıcı yöntemlerdir ve çoğunlukla rutin olarak uygulanmamaktadır. Anaerob bakterilerin duyarlılık deneylerinde yaşanan diğer sıkıntılar ise; standardizasyonun sağlanamaması, tanımlanan izolatlarla ait verilerin azlığı, az sayıda cinsin denenmesi, seçilen bir türün diğer türleri temsil etmemesi, klinik breakpoint ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerlerinin yakın olması şeklinde sıralanabilir.

Ancak steril bölgelerden ve tek etken olarak izole edilen anaerob bakterilerde, *Bacteroides fragilis* gibi yüksek virülansa sahip olan dirençli türlerde, ampirik tedavi seçiminde karar verilemeyen durumlarda, ampirik tedaviye rağmen iyileşmeyen olgularda ve uzun süreli tedavi gerektiren enfeksiyonlarda duyarlılık test yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir.

Çalışmada virülansı yüksek olan ve anaerob enfeksiyonlarda sıklıkla izole edilen *Bacteroides* türlerinde antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde yeni bir protokol geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca anaerob bakterilerde antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarının 24-48 saate varan sonuç verme süresinin, akım sitometri yöntemi ile saatlere indirgenmesi hedeflenmektedir. Çalışmada klinik örneklerden izole edilen anaerob bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinin uygulanmasındaki zorluklar ve yüksek maliyet göz önüne alınarak akım sitometrisi ile *Bacteroides* türlerinde duyarlılık/direnç oranlarının tespit edilmesi ve diğer antibiyotik duyarlılık test yöntemlerine karşı hızlı, güvenilir ve maliyet etkin alternatif bir yöntem olup olmayacağı araştırılmak istenmiştir.

GENEL BİLGİLER

Anaerop bakteriler insan vücudunda oldukça yaygın olarak bulunan mikroorganizmalardır. Anaerop bakterilerin varlığı ilk olarak, 17. yüzyılda Antonie Van Leeuwenhoek'un geliştirdiği mikroskop ile gözlemlendiği bazı küçük canlıların oksijensiz ortamda dahi hareket edebildiğini ileri sürmesi ile ortaya çıkmıştır (1). Pastörizasyonun temelini oluşturan Louis Pasteur, yaptığı çalışmalarla anaerop bakteriyolojinin temel taşlarını inşa etmiştir. 1861'de Pasteur bütirik asit fermentasyonunun hareketli, spor oluşturan mikroorganizmalarla ilişkisini ortaya koymuştur ve bu canlıların oksijensiz ortamda basit besiyerlerinde üreyebildiğini görmüştür. Bunun üzerine Pasteur 1863 yılında mikroorganizmaları aerop ve anaeroplara olmak üzere ikiye ayırmıştır (2).

1800'lü yılların sonunda Veillon ve Zuber kötü kokulu cerahatler ve pek çok enfeksiyonda anaerop bakterilerin rolü olduğunu belirterek anaerop bakteriyolojiye katkı sağlamışlardır. Aynı yıllarda Schottmueller lohusalık hummasına endojen kaynaklı anaerop kokların neden olabileceğini belirtmiştir.

Anaerop bakterilerle yapılan çalışmalar 1930'lu yıllarda da devam etmiştir. Meleney ve Altemeier isimli Amerikalı çalışmacılar cerrahi enfeksiyonlar ve yumuşak doku enfeksiyonlarında anaerop bakterilerin önemli rolü olduğunu bildirmişlerdir.

Ancak anaerop bakterilerin ilk olarak izole edilmesi 20. yüzyılın başlarında anaerop koşulların sağlanması ve anaerop kavonozların geliştirilmesiyle gerçekleşmiştir.

1960'lı yıllara kadar yapılan anaerop bakteri çalışmalarında *Clostridium* cinsi ile yapılan çalışmalar ağırlıklı olmuştur. Bu yıllardan sonra yapılan çalışmalarla *Clostridium* cinsinin neden olduğu enfeksiyonların, anaerop bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların ancak % 10'unu oluşturduğu görülmüştür (1,3).

Son 30 yıldır izolasyon teknikleri ve moleküler yöntemlerin hız kazanması ile anaerop bakterilerle yapılan çalışmalar da ivmelenmiş, özellikle virülans faktörleri ve antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları oldukça yoğunluk kazanmıştır.

Anaerop bakteriler yaşama ve üremeleri için oksijene ihtiyaç duymayan bakterilerdir. Anaerop bakteriler moleküler oksijen ile olan ilişkilerine göre ‘zorunlu anaerop’, ‘mikroaerotoleran anaerop’, ‘aerotoleran anaerop’ ve ‘fakültatif anaerop’ olarak sınıflandırılırlar (4).

ANAEROP BAKTERİLERİN SINIFLANDIRILMASI

Zorunlu Anaeroplara

Zorunlu anaerop bakteriler katı besiyerinde %0,5’den fazla oksijen varlığında üreyemeyen, salt oksijensiz ortamda üreyebilen bakterilerdir (Örn; *Clostridium novyi* tip B, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* ya da *Peptostreptococcus* türleri). Zorunlu anaeroplara birkaç dakikalık hava temasında ölürlere. Normal florada bulunmalarına rağmen klinik örneklerden nadiren izole edilirler. Ancak bu grup içinde %2-8 (~ %3) oksijen varlığında üreyebilen ve ılımlı anaeroplara olarak adlandırılan (Örn; *Bacteroides fragilis* grubu) bakteriler bulunur. Besiyeri yüzeyinde havadaki oksijeni birkaç saat tolere edebilir, üremek için anaerop atmosfere ihtiyaç duyarlar (4).

Mikroaerotoleran Anaeroplara

Mikroaerotoleran bakteriler ise, ancak %4-6 O₂'i tolere ederek üreyebilirler. Oda atmosferinde (%20 O₂ altında) günler sonra cılız koloniler geliştirebilirler, fakat anaerobik atmosferde daha bol ürerler. *Lactobacillus* ve *Camphylobacter* üyeleri bunlara bir örnek teşkil eder (4).

Aerotoleran Anaeroplara

Aerotoleran anaerop bakteriler zorunlu anaerop oldukları halde sonradan %2-8 arasında O₂ toleransı gösteren bakterilerdir. Aerotoleran ve mikroaerofilik bakterilerin arasındaki sınır keskin değildir (4).

Fakültatif Anaeroplara

Aslında aerop olan bu bakteriler alternatif metabolizma geliştirip anaerop üremeyi tercih ederler. *Enterobacteriaceae* üyeleri ve bilinen daha pek çok bakteri ailesi aslında fakültatif anaeroptur (4).

ANAEROPLARIN NORMAL FLORADAKİ DAĞILIMI

Anaerop bakteriler vücudun pek çok bölgesinde (kalın barsak, ağız boşluğu, vajina, deri) normal flora elemanları olarak bulunurlar. Vücudun bu bölgelerindeki bulunma oranları Tablo 1’de gösterilmiştir.

Deri: Deri anaerop florası *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus* ve diğer anaerop gram pozitif koklar ve bazen *Eubacterium* cinsi bakterilerden oluşmaktadır (1).

Üst Solunum Sistemi: Burun ve ağızdan alınan örneklerdeki anaerop bakteri sayısı aerop bakterilerin sayısına eşit veya daha fazla sayıdadır. Bu sebeple tüm ağız lezyonlarında, aspirat pnömonisi olgularının çoğunda ve kulak burun boğaz enfeksiyonlarında anaeroplara yer alır. En çok *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, anaerop gram pozitif koklar, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* ve *Actinomyces* türleri bulunur. Bu özel anaeroplara solunum sisteminden kaynaklanan herhangi bir enfeksiyöz sürece katılabilirler (1).

Vajina: Servikal ve vajinal sekresyonlardaki bakterilerin yaklaşık %50'si anaeroptur. Anaerop gram pozitif koklar, *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, *Mobilincus*, bazı anaerop laktobasiller ve *Actinomyces* türleri en sık rastlananlardır. *Actinomyces* ve *Eubacterium nodatum* intrauterin araç ve aktinomikotik enfeksiyonla ilişkilidir. Anüse yakın diğer anaeroplara ise; *Clostridium*, *Eubacterium*, *B. fragilis* grubu, *Porphyromonas* türleridir. Gram negatif çomaklardan ise *P. bivia* ve *P. disiens* en sık rastlanan türlerdir. Pigmentli gram negatif anaerop çomaklardan ise *B. fragilis* grubu, *Prevotella* ve diğer *Bacteriodes* türlerine rastlanabilir. Ancak vajina ve servikal sürüntü örneklerinden anaerop bakteriler izole edildiğinde ne mikrobiyologlar ne de klinisyenler enfeksiyona neden olan anaerop bakterileri endojen flora kontaminasyonundan ayırt edemezler. Bu yüzden genitoüriner sistem sürüntü örnekleri anaerop bakteriyoloji için uygun örnekler değildir (1).

Barsak: Barsak florasını oluşturan anaerop bakteriler *B. fragilis* grubu, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus* ve diğer anaerop gram pozitif koklar, *Prevotella* ve *Porphyromonas* türleridir. *B. fragilis* grubu içinde en sık rastlanan tür *B. thetaiotaomicron*'dur (1).

Tablo 1. Normal florada bulunan anaerop-aerop bakteri oranları

Anatomik bölge	Anaerop:Aerop oranı
Üst solunum yolları	3-5:1
Burun yıkantı suyu	1:1
Tükürük	1:1
Diş yüzeyi	1000:1
Diş plakları, diş-yüzeyi cepleri	10 ³ :1
Gastrointestinal sistem	
Mide	1:1
İnce barsak	1:1
Kolon	1000:1
Kadın genital sistemi	
Endoserviks	1-5:1
Vajna	1-5:1

ANAEROP ENFEKSİYONLARDA PREDİSPOZE FAKTÖRLER

Anaerop bakteriler, insan florasında önemli bir yere sahiptirler. Normal koşullarda enfeksiyon oluşturmazlar, ancak bazı durumlarda ciddi seyirli enfeksiyon etkeni olabilmektedirler. Genellikle fakültatif anaerop bakterilerle birlikte miks enfeksiyon oluştururlar. Anaerop bakterileri enfeksiyonları için predispozan faktörler şu şekilde sıralanabilir (1,5):

- Cerrahi girişim, travma gibi durumlarda doku bütünlüğünün bozulması
- İskemi
- Dokularda oksidasyon-redüksiyon potansiyelinin azalması
- Bakteriyel inokulumun miktarı
- Diğer organizmalarla sinerjizm
- Organizmanın virülans özellikleri
- Konak savunma mekanizması
- Malignite

ANAEROP BAKTERİLERDE DUYARLILIK TESTLERİNİN UYGULANMASINI GEREKTİREN DURUMLAR

Anaerop kültür yöntemlerinin uygulanması her aşamasında pek çok zorluk içermektedir. Bu zorluklar göz önüne alındığında anaerop bakterilerin duyarlılık testlerinin rutin olarak test edilmesi pek mümkün olmamaktadır. Ancak bazı durumlarda bu testlerin uygulanması gerekmektedir. Anaerop bakterilerin duyarlılık testlerinin uygulanma endikasyonları şu şekilde belirtilmiştir (6,7):

- Yeni antimikrobiyal ajanlara duyarlılıkların belirlenmesi
 - Coğrafik olarak belirli bölgelerde ve merkezlerde duyarlılık profillerinin tayini
 - Beyin apsesi, bakteriyemi, endokardit gibi hayatı tehdit eden enfeksiyonlar
 - Ampirik tedaviye yanıt vermeyen olgular
 - Osteomyelit, septik artrit, protez enfeksiyonları gibi uzun süre tedavi gerektiren durumlar
 - Klinik örneklerden *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Clostridium* türleri gibi yüksek virülansa sahip olan anaerop bakterilerin izole edilmesi
- Ancak anaerop bakterilerin duyarlılık test yöntemleri pek çok zorluklar

içermektedir. Bu zorluklar şu şekilde sıralanabilir (8,9):

- Test yöntemlerinde her tür için standardizasyonun sağlanamaması
- Breakpoint (sınır değer)'in seçimi ve breakpoint ile MİK değerlerinin birbirine yakın olması
- Yeni tanımlanan izolatlar için verilerin azlığı
- Antimikrobiyal duyarlılık yöntemlerinde az sayıda cinsin denenmesi
- Seçilen türlerin diğer türleri temsil etmemesi
- Klinik-laboratuvar işbirliğinin yetersiz olması

Yukarıda belirtilen zorlukların yanı sıra, anaerop bakterilerin duyarlılıklarının belirlenmesinde laboratuvar uygulamaları ile ilgili de sıkıntılar yaşanabilmektedir. Bunlar (8,9):

- Antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde farklı yöntemlerin kullanılması
- Yanlış yapılan bakteri tanımlamaları
- Bazı laboratuvarların MİK değeri belirken üremenin önemli ölçüde azaldığı dilüsyonu kabul ederken, bazı laboratuvarların üremenin tamamen inhibe olduğu dilüsyonu kabul etmesi
- Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde farklı besiyerlerinin kullanılması

ANAEROP BAKTERİLERDE DUYARLILIK TEST YÖNTEMLERİ

Anaerop bakterilerde antimikrobiyal direncin saptanması amacıyla geliştirilen yöntemler şunlardır (6-8,10-14):

1. Agar dilüsyon yöntemi (Wadsworth Yöntemi)
2. Sıvı dilüsyon yöntemi

2.a) Mikrodilüsyon yöntemi

2.b) Makrodilüsyon yöntemi

Ticari olarak mevcut hazır yöntemler:

1. E (Epsilon) testi
2. Spiral-gradyent-endpoint sistemi
3. β -Laktamaz testi
4. Broth mikrodilüsyon panelleri
5. Anaerop duyarlılık panelleri

Agar Dilüsyon Yöntemi (Wadsworth Yöntemi): Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından kabul edilen referans yöntemdir. Farklı konsantrasyonlardaki antimikrobiyal ajanların çift kat seri dilüsyonlarının hazırlanıp agar plaklarına ilave edilmesi ile bir veya daha fazla ilaca karşı çok sayıda izolatın (32-36 inokulum) aynı anda test edilmesini sağlar. Ancak yöntem birden fazla antimikrobiyal ilaca karşı az sayıda bakteri kökeni çalışılması için pratik bir yöntem değildir. Zaman alıcı ve yoğun emek gerektiren bir yöntem olması nedeni ile agar dilüsyon yöntemi mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak yapılamamaktadır. Besiyeri olarak Vitamin K1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), hemin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ile zenginleştirilmiş ve pek çok anaerop bakterinin üremesi için gerekli olan defibrine koyun kanı (%5) ilave edilmiş brucella agar plakları kullanılır. Anaerop bakteriler için yapılacak agar dilüsyon testi için brucella agarın yanı sıra Wilkens-Chalgren agar da kullanılabilir. Ancak gram negatif çomaklar için Wilkens-Chalgren agar yerine brucella agarın kullanılması tavsiye edilmektedir. Agar plağı üzerindeki son inokulum 1×10^5 colony forming unit (CFU) olacak şekilde en düşük konsantrasyonda antibiyotik içeren plaktan başlanarak plaklara ekim yapılır. Kullanılan antimikrobiyallerin potenslerinin düşeceği hesaba katılarak hazırlanan petriyeler referans çalışmalar için 4–8°C’de en fazla 5 gün saklanmalıdır. İmipenem içeren plaklar hazırlandıkları gün kullanılmalıdır. İnokülasyonu yapılan agar plakları 42-48 saat 37 °C’de anaerobik atmosfer (%5-10 H₂, %5-10 CO₂, %80-90 N₂) içeren anaerobik kabin, anaerobik poşet veya anaerob jarlarda inkübe edilir. 48 saatlik inkübasyon sonunda agar plaklarında üremeyi inhibe eden son konsantrasyon MİK olarak belirlenir. Tek bir koloni üremesi veya inokülasyonun neden olduğu üreme

benzeri iz dikkate alınmaz. Bu nedenle kontrol plağına göre üremenin %80 veya daha fazla azaldığı gözlenen konsantrasyon MİK olarak belirlenir. İçerisinde antimikrobiyal madde içermeyen brucella agar plakları üreme kontrolü olarak kullanılır. Yapılan her bir çalışma sonrasında hazırlanan bakteri süspansiyonlarından aerobik saflık kontrolü ve inokulum konsantrasyonu kontrolü yapılmalıdır. Kalite kontrol suşu olarak ise *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, *Eubacterium lentum* ATCC 43055 kullanılır (6-8,10-14).

Sıvı Dilüsyon Yöntemi

1. Mikrodilüsyon Yöntemi: Broth mikrodilüsyon olarak da bilinen bu yöntem agar dilüsyon testine göre daha pratik ve uygulanabilir bir yöntemdir. Ancak zayıf üreyen ve oksijen hassasiyeti yüksek olan anaerop bakteriler için sınırlı olup, CLSI tarafından sadece *B.fragilis* grubunun üyeleri için onaylanmıştır. Mikrokuyucuklardaki son bakteri konsantrasyonu aerop bakterilerde 5×10^5 CFU/mL iken anaerop bakterilerde 1×10^6 CFU/mL'dir. Yöntem aynı anda 10'dan fazla antimikrobiyal ajana karşı duyarlılık çalışmasına fırsat vermekle birlikte, her laboratuvar kendine ait duyarlılık panelini oluşturabilir. Mikrodilüsyon plakları bir kez hazırlandıktan sonra -70 °C'de 6 aya kadar saklanabilir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi için ticari olarak temin edilebilir paneller bulunmaktadır (6-8,10-14).

2. Makrodilüsyon Yöntemi: Özellikle Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) değerinin belirlenmesinde bu yöntem tercih edilir. Antibiyotikli sıvı besiyerinde son bakteri konsantrasyonu $1,5 \times 10^6$ CFU/mL olacak şekilde steril tüpler kullanılarak uygulanır. İçerisinde antibiyotikli sıvı besiyeri bulunan 1 mL dilüsyon tüpüne 1 mL hazırlanan bakteri süspansiyonundan ilave edilir. Bu işlem sonunda tüpteki antimikrobiyal ilaç ve bakteri inokulumu 1:2 oranında sulandırılmış olur. Böylece son bakteri konsantrasyonu $\sim 1,5 \times 10^6$ CFU/mL olur. Eşit hacimde inokulum eklendiğinde ilaçlar 1:2 sulanmış olduğundan antimikrobiyal sulandırılmaları istenilen konsantrasyonun katları şeklinde hazırlanır.

CLSI'ın her iki sıvı dilüsyon yönteminde önerdiği besiyeri; içerisinde hemin ($5 \mu\text{g/mL}$), vitamin K1 ($1 \mu\text{g/mL}$) ve 5% defibrine at kanı bulunan brucella broth'dur. Ayrıca beyin kalp infüzyon buyyon, modifiye Schaedler buyyon ve Wilkins-Chalgren buyyon besiyerleri de kullanılabilir. İnokülasyon yapılan

mikroplaklar ve tüpler 37 °C’de anaerobik atmosferde 46-48 saat inkübe edilir. İnkübasyon sırasında kurumayı önlemek amacı ile mikroplakların üzeri torba, plastik bant veya plastik bir kapakla kapatılır. Üremenin çıplak gözle tamamen inhibe olduğunun görülebildiği en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu MİK olarak belirlenir (6,13).

E Test (MİK Gradyent Difüzyon Testi)

Dilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin kombine edilmesiyle geliştirilen bir yöntemdir. Kesin ve doğru MİK değerleri veren bir yöntemdir. Nadir hasta izolatları için pratik bir yöntem olmasına rağmen sürveyans çalışmaları için maliyeti yüksek bir yöntemdir. Ayrıca güç üreyen anaerop bakteriler için avantajlı bir yöntem değildir. Zenginleştirilmiş brucella agar üzerine 1 McFarland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu inoküle edilir. 24-48 saatlik inkübasyon sonrasında eliptik bir inhibisyon zonu oluşur. MİK değeri, elips ile MİK yorum skalasının kesişme noktası olarak kabul edilir (6-9,11-14).

Spiral-Gradient-Endpoint Yöntemi

‘Spiral plater (Spiral dağıtıcı)’ adı verilen bir alet kullanılarak yöntem uygulanır. Alet, belirli miktardaki ilaç konsantrasyonunu besiyeri yüzeyine merkezden çevreye doğru azalacak şekilde inoküle eder. 4-6 saat anaerobik ortamda ilacın besiyerine difüze olması beklenir. 0,5 McFarland standart bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonları radyal inokülatör ile radyal çizgiler oluşturacak şekilde besiyerine bırakılır. Plaklar 37 °C’de anaerobik atmosferde 48 saat inkübe edilir. Çizgi şeklinde üremiş olan bakterilerin üremelerinin sona erdiği nokta ile merkez arasındaki mesafe ölçülür. Ölçümler üretici firmanın bilgisayar programında değerlendirilerek Minimum Aktivite Konsantrasyonu (MAC) saptanır. MİK değeri MAC değerine eşit veya ona yakın olan en yüksek çift kat dilüsyon değeridir (6-8,12)

β-Laktamaz Testi

Beta-laktamaz varlığında hidrolize olan kromojenik bir sefalosporin (nitrosefin veya sefinaz) kullanılarak yapılan bir testtir. Beta-laktamaz varlığında kullanılan disklerde veya striplerde renk değişimi gözlenir. Bazı reaksiyonlar 5-10 dakika içinde oluşurken, bazı reaksiyonların sonuç vermesi 30 dakikaya kadar uzayabilmektedir. Beta-laktam ilaçlara direnç her zaman beta laktamazlarla ilişkili

olmadığından beta-laktam antibiyotiklere direnci saptamada yararı sınırlıdır (6-8,10-14).

Sıvı Mikrodilüsyon Panelleri: Liyofilize ya da dondurulmuş 15 farklı antibiyotiğin seri dülüsyonlarını içeren hazır broth mikrodilüsyon panelleridir. Ticari olarak temin edilebilen bu paneller şunlardır:

- Anaerobe Sensititre panel (ANO2, Thermo Fisher, US)
- Oxoid, Remel (Thermo Fisher, US)
- ATB-ANA (bioMe´rieux, Marcy l’Etoile, France)
- MHK-Anaerob-Biotest (Biotest-Serum-Institut, FRG)
- Dynatech MIC System (Dynatech, FRG)
- Spector Anaerobe MIC System (Becton Dickinson, FRG)

Daha çok araştırma amacı ile kullanılan bu sistemler diagnostik amaçlı kullanılmamaktadır. Sensititre yöntemi (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH, US) ise bu hazır panellerin yarı otomatize hale getirildiği bir sistemdir. Bu paneller liyofilize ya da dondurulmuş olarak bulunabilmektedir (8,11,12,15).

CLSI’ın önermediği yöntemler ise şunlardır (8,10,11).

1. Buyyonda disk elüsyon yöntemi
2. Disk difüzyon yöntemi

Buyyonda Disk Elüsyon Yöntemi: Disk elüsyon yönteminde, disk difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotik içeren kağıt diskler sıvı besiyerine konularak antibiyotiklerin istenilen konsantrasyonları elde edilir. Ancak bu yöntemle elde edilen sonuçların referans yöntemle uyumsuz olduğu bildirilmektedir. Bu yöntem, özellikle *B. fragilis* türlerinde MİK değerleri ile breakpoint konsantrasyonları birbirine yakın olduğundan problem olmaktadır. Disklerin sıvı besiyeri içerisinde dağılması sonuçlarda hataya neden olabilmektedir.

Disk Difüzyon Yöntemi: Anaerop bakterilerin güç üremelerinden dolayı standardize edilmiş inhibisyon çapının olmaması, yöntemin uygulanmasını engelleyen en önemli faktördür.

ANAEROP BAKTERİLERİN DUYARLILIK TEST YÖNTEMLERİNDE KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER

Anaerop bakterilerin duyarlılık test yöntemlerinde CLSI'nın (M11-A6) test edilmesini ve raporlanmasını tavsiye ettiği antibiyotikler aşağıda verilmiştir (Tablo 2) (11,14):

Tablo 2: Anaerop enfeksiyonlarda test edilen ve raporlanan antibiyotikler

<i>Bacteroides fragilis</i> grup ve diğer anaerop gram negatif anaeroplara	Gram pozitif anaeroplara
Amoksisilin-Klavulanat	Amoksisilin-Klavulanat
Ampisilin-Sulbaktam	Ampisilin-Sulbaktam
Piperasilin-Tazobaktam	Piperasilin-Tazobaktam
Tikarsilin-Klavulanat	Tikarsilin-Klavulanat
Klindamisin	Klindamisin
Doripenem	Doripenem
Ertapenem	Ertapenem
İmipenem	İmipenem
Meropenem	Meropenem
Metronidazol	Metronidazol
Primer antibiyotiklere ilaveten raporlanabilen antibiyotikler	
Ampisilin	Ampisilin
Penisilin	Penisilin
Seftizoksım	Seftizoksım
Seftriakson	Seftriakson
Sefotetan	Sefotetan
Sefoksitin	Sefoksitin
Piperasilin	Piperasilin
Tikarsilin	Tikarsilin
Kloramfenikol	
Moksifloksasin	

AKIM (FLOW) SİTOMETRİ

Akım sitometri, süspansiyon halindeki hücrelerin, bir akış kanalı boyunca ilerlerken tek tek tespit edilmesini ve ayrışımını sağlayan bir tekniktir. İlk kez 1934 yılında Moldaven isimli araştırmacı bu tekniği geliştirmiştir ve ilk defa 1940'lı yılların sonunda II. Dünya Savaşı'nda aerosoller içindeki bakterileri ve sporları tespit

etmek amacı ile kullanılmıştır (16). Gucker ve arkadaşları akım sitometri yönteminin aerosollerde uygulanabileceği gibi, bakteri hücreleri gibi biyolojik örneklerle de çalışılabileceğini raporlamışlardır. Böylelikle mikrobiyolojide flow sitometri uygulamaları başlamıştır (17). İlk kez Wallace H. Coulter tarafından hazırlanan 'High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer' isimli ilk flow sitometri cihazı 1956 yılında yayınlanmıştır (18).

Işık mikroskobuna kıyasla birim zamanda daha fazla hücre analizi yapılabilmektedir. Ayrıca akım sitometri yöntemi ile hücreye ait pek çok veri kalitatif olarak alınabilmektedir.

Kan, kemik iliği, beyin omurilik sıvısı, bronkoalveoler lavaj sıvısı, eklem sıvısı, plevral sıvı, asit sıvısı, doku biyopsi örnekleri, hücre kültürü örnekleri akım sitometri analizi için kullanılabilen örneklerdir (19,20).

Akım Sitometri Çalışma Prensipleri

Akım sitometride süspansiyon halindeki hücrelerin her biri, bir akış kanalı boyunca ilerlerken lazer demetinin içinden geçer ve bu lazer demetinin bir kısmını yansıtırlar. Ayrıca her bir hücre lazer tarafından uyarıldığından, yani ekstra enerji kazanmış olduğundan floresan ışığı yayarlar. Hücreler tarafından yansıtılan bu floresan ışınlar cihazın optik sistemi tarafından toplanarak analiz edilir (18-20).

Akım Sitometri Bileşenleri

1. Sıvı sistem: Sıvı sistem, birbirine karışmayan ikili bir sistemdir. İç taraftaki sıvı hücrelerin lazer demeti içinden akışını sağlarken, bunu çevreleyen dış taraftaki sıvı bir 'hidrodinamik odaklanma' oluşturur. Hücreler bu 'hidrodinamik odaklanma' ile lazer demetinin önüne tek tek düşerler ve böylece her bir hücrenin kendine özgü analizi yapılır (18).

2. Optik sistem: Optik aynalar, lazer ve lensleri içeren sistemdir. Lensler lazer ışığını odaklamak için kullanılır. Lazer hücreye çarptıktan sonra saçılıma uğrar. Hücrelerden gelen lazer saçılımları bize hücre hakkında bilgi verir. İleri ve yana saçılım olmak üzere iki farklı saçılım vardır. Bu lazer saçılımları ve floresan emisyonu filtre ve dedektörler aracılığı ile dijital sinyallere dönüştürülür. Her bir dedektör ve filtre bize hücre hakkında farklı veriler sağlar (18).

3. FSC (forward scatter channel) dedektörü (İleri saçılım kanal dedektörü): Lazer ışığı ile aynı doğrultuda ve en fazla 20° açıyla etrafa saçılan

ışınlar forward scatter chanel (FSC) denilen bir lens yardımıyla toplanır ve hücrenin büyüklüğü hakkında bilgi verir (18).

4. SSC (side scatter chanel) dedektörü (Yana saçılım kanal dedektörü): Hücrenin yüzeyinden 90^0 açıyla yayılan ışınları toplayan dedektördür ve hücrenin iç granüler yapısı ile ilgili bilgi verir.

Toplam ışık saçılmasını etkileyen faktörler; membran, nükleus, hücrenin granüllüğü, hücrenin şekli ve yüzey özellikleridir. Heterojen bir hücre popülasyonu içerisinde hücre tiplerinin ayırtedilebilmesi için FSC ve SSC ölçümlerinin birlikte kullanılması gerekir (18).

5. Floresan filtreler ve dedektörler: Florokrom maddeler veya floresan işaretli antikor kullanılmak suretiyle; floresan filtreler ve dedektörler tarafından farklı dalga boylarında yapılan floresan ölçümler, bu florokromlarla işaretlenmiş hücre yüzey reseptörleri, sitokinler, DNA gibi intrasellüler moleküller hakkında bilgi verir (16). Akım sitometri ile yapılan çalışmalarda kullanılabilen floresan boyalar Tablo 3’de belirtilmiştir (21).

6. Elektronik sistem: Saçılıma uğrayan lazer ışınları ve hücreler tarafından yansıtılan floresan ışık bir araya getirilir, optik filtreler ve aynalar yardımı ile farklı dalga boylarına ayrılarak sinyallere dönüştürülür. Bu sinyaller dijitalleştirilir ve bilgisayar ekranına veri olarak aktarılır (16).

Akım Sitometri ve Mikrobiyoloji

Mikrobiyoloji alanında akım sitometrinin kullanımının en büyük avantajı, heterojen bir mikrobiyal popülasyonda her bir hücreye ait özgün verinin ölçülebilmesidir (18-21). İlk olarak 1987 yılında Human ve arkadaşlarının idrarda bakterileri akım sitometri kullanarak tespit etmesiyle, akım sitometri yöntemi klinik mikrobiyolojide kullanılmaya başlanmıştır. Akım sitometrinin mikrobiyolojideki kullanım alanları Tablo 4’de özetle belirtilmiştir (19).

Tablo 3: Mikrobiyolojide akım sitometri uygulamalarında kullanılan floresan boyalar (21)

Boya	Eksitasyon dalga boyu (λ_{\max}) (nm)	Emisyon dalga boyu (λ_{\max}) (nm)	Bağlanma bölgesi/ Substrat	Uygulama Alanı
TOTO-3	642	660	DNA, RNA	DNA miktar tayini, hücre döngüsü çalışmaları
SYTOX Green	504	525	DNA, RNA	Canlılık, DNA miktar tayini çalışmaları
PI (Propidium iodide)	536	625	DNA, RNA	Canlılık, DNA miktar tayini, hücre döngüsü çalışmaları
Ethidium bromide	510	595	DNA, RNA	DNA miktar tayini, hücre döngüsü çalışmaları
Hoechst 33258/ 33342	340	450	DNA (GC)	Hücre döngüsü çalışmaları
SYTO 13	488	509	DNA, RNA	Canlılık, DNA miktar tayini, hücre döngüsü çalışmaları
Mithramycin	425	550	DNA	Hücre döngüsü çalışmaları
Pyronine Y	497	563	RNA	RNA miktar tayini
FITC (Fluorescein isothiocyanate)	495	525	Protein	Mikroorganizma tayini
Texas Red (sulforhodamne isothiocyanate)	580	620	Protein	Mikroorganizma tayini

(devam ediyor)

Tablo 3: Mikrobiyolojide akım sitometri uygulamalarında kullanılan floresan boyalar (21) (devam ediyor)

Boya	Eksitasyon dalga boyu (λ_{max}) (nm)	Emisyon dalga boyu (λ_{max}) (nm)	Bağlanma bölgesi/ Substrat	Uygulama Alanı
Oregon Green isothiocyanate	496	526	Protein	Mikroorganizma tayini
Indo-1	340	398-485	Ca ⁺²	Ca ⁺² mobilizasyonun tespiti
Fura-2	340	549	Ca ⁺²	Ca ⁺² mobilizasyonun tespiti
Fluor-3	469	545	Ca ⁺²	Ca ⁺² mobilizasyonun tespiti
BCECF	460-510	520-610	pH	Metabolik farklılıkların tespiti
SNARF-1	510	587-635	pH	Metabolik farklılıkların tespiti
DIOC ₆ (3)	484	501	Membran potansiyeli	Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları, metabolik değişikliklerin tespiti
Oxonol (DiBAC ₄ (3))	488	525	Membran potansiyeli	Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları, metabolik değişikliklerin tespiti
Nile Red	490-550	540-630	Lipitler	-

Tablo 3: Mikrobiyolojide akım sitometri uygulamalarında kullanılan floresan boyalar (21)
(devam ediyor)

Boya	Eksitasyon dalga boyu (λ_{max}) (nm)	Emisyon dalga boyu (λ_{max}) (nm)	Bağlanma bölgesi/ Substrat	Uygulama Alanı
Rhodamine 123	507	529	Membran potansiyeli (mitokondriyal)	Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları, metabolik değişikliklerin tespiti
Fun-1	508	525-590	Maya vakuolar enzim aktivitesi	Maya metabolizması çalışmaları
Lectines	Florokrom konjugatına bağlıdır	Florokrom konjugatına bağlıdır	Membran oligosakkaritleri	Hücre duvarı bileşenlerinin tespiti, mikroorganizma tespiti
Floresan işaretli oligonükleotidler	Florokrom konjugatına bağlıdır	Florokrom konjugatına bağlıdır	Nükleotid dizileri	Mikroorganizma tespiti
Calcofluor white	347	436	Kitin ve diğer karbonhidrat polimerleri	Mantarların tespiti
Florokromlara bağlı substratlar	-	-	Enzim aktiviteleri	Metabolik aktivitenin belirlenmesi
Florokrom işaretli antikolar	-	-	Antijenler	Mikroorganizma tespiti

Tablo 4: Mikrobiyolojide akım sitometri yöntemi ile yapılabilen analizler (19)

Hücre büyüklüğü	FSC dedektörü kullanılarak karışık hücre popülasyonlarında, oluşan ışık saçılımına göre hücrenin büyüklüğü hakkında bilgi edinilir. Bu teknikle bakteri, mantar ve parazitlerin ayrımı kolaylıkla yapılabilir.
DNA içeriği	Çeşitli floresan boyalar kullanılarak organizmaların DNA miktarı ölçülebilmektedir. Özellikle bakterilerde kültür ortamında DNA sentezi devam ettiğinden, antibiyotiklerin bakteriler üzerindeki etkisi bu yolla saptanabilmektedir.
DNA baz kompozisyonu	(Guanin+Sitozin)/DNA oranı her bakteri türünde sabit olduğu için, A-T ve G-C moleküllerine değişik bağlanma afinitesi olan farklı floresan boyaların kullanılmasıyla bakterilerin tanımlanması yapılabilmektedir.
RNA içeriği	RNA içeriği bakterilerde farklı üreme fazlarında değiştiğinden tek başına bakterilerin tanımlanmasında yeterli olamamakta, mikrobiyolojide diğer parametrelerle birlikte kullanılmaktadır.
Protein içeriği	Protein içeriği ve DNA baz içeriği kullanılarak bakteri, mantar, protozoa ve alg ayrımı yapılabilmektedir.
Hücre antijenleri	Mikroorganizmalara spesifik monoklonal antikorların kullanılmasıyla bakteri, mantar, parazit ve virüslerin tanımlanması yapılabilmektedir.
Hücre membran potansiyeli	Bakterilerde ısı gibi fiziksel bir etki veya antibiyotik gibi kimyasallar kullanılarak hücre membran potansiyelinde meydana gelen değişiklikler sonucunda antibiyotik duyarlılık çalışmaları yapılabilmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada; Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilimdalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'na proje kabul tarihinden itibaren rutin anaerop kültür isteğiyle gönderilen örneklerden izole edilen ve %10'luk skim milk solüsyonu içerisinde -80°C'de stoklanan *Bacteroides* türleri kullanıldı. *Bacteroides* türlerinin tanımlanması MALDI TOF-MS Microflex LT (Bruker Daltonics) yarı otomatize sistem ile yapıldı.

İzole edilen *Bacteroides* türlerinin belirli antibiyotiklere (penisilin G, klindamisin, kloramfenikol, amoksisilin-klavulanik asit, meropenem, metronidazol) olan duyarlılıkları, referans yöntem agar dilüsyon yöntemi ile belirlendi. Çalışmada ayrıca E test yöntemi kullanıldı.

Kullanılan antibiyotiklerin EUCAST'de belirtilen klinik sınır değerleri kullanılarak anaerop bakterilerin akım sitometri yöntemi ile canlılık/ölüm oranları değerlendirildi. Bunun için hücre geçirgen thiazole orange (TO) ve hücre geçirgen olmayan propidium iodide (PI) floresan boya kullanıldı.

Kontrol çalışmaları için *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 kullanıldı.

Bacteroides türlerinde antimikrobiyal duyarlılığa karar vermede 'Klinik Sınır Değer PI Boyanma Oranı (%)' kullanıldı. Klinik sınır değer (break point) hesaplanmasında ROC (Receiver Operating Characteristic-İşlem Karakteristik Eğrisi) analizi yapıldı. ROC analizi ile duyarlı ve dirençli suşları ayırt etmek için bir cut-off değeri hesaplandı. İstatistiksel analizler için SPSS 21 kullanıldı.

Çalışma için Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırma Etik Kurulu'ndan 12.04.2017 tarih ve 2012- KAEK-15/1385 sayılı karar ile onay alınmıştır (Bkz. EK-1, EK-2, EK-3). Çalışmada Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Birimi (Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi) tarafından 02.11.2017 tarihinde kabul edilen 2017/038 numaralı proje desteği ile sağlanan sarf malzemeleri kullanılmıştır.

ANAEROBİK ORTAM SAĞLAMAK İÇİN KULLANILAN SİSTEMLER

- Anaerobik Jar Sistemi (Anaeropack-Anaero/MGC)
- Anaerobik Kabin (Bactron IV Anaerobic/Environmental, SHEL LAB)

KULLANILAN BESİYERLERİ

Brucella Blood Agar

Brucella Agar (OXOID, UK)	43 g
Vitamin K1 solüsyonu (1 mg/mL)	1 mL
Distile su	1000 mL
Defibrine at kanı	50 mL
Hemin (5 mg/mL)	1 mL

Agar dilüsyon testi için CLSI'nin önerdiği vitamin K1 (1 mg/mL) ve hemin (5 mg/mL) ile zenginleştirilmiş brucella kanlı agar besiyeri kullanıldı. Brucella kanlı agar, otoklavlanmadan önce hemin ve vitamin K1 ilave edildi. Otoklavda 15 dakika 121 °C'de sterilize edildikten sonra 48-50 °C'ye soğutuldu. Agar dilüsyon testi için steril plaklara, hazırlanan besiyerinden kalınlığı 4 mm olacak şekilde 18 mL döküldü ve üzerine antimikrobisyonların seri dilüsyonlarından 2 mL ilave edildi. Bu durumda besiyeri içerisine ilave edilcek olan antibiyotik çözeltileri 1:10 dilüe olacağından, agar plağına istenilen antibiyotik konsantrasyonundan x10 kat olacak şekilde ilave edildi. E test çalışmaları için brucella kanlı agar (Liofilchem, Italy) besiyerleri kullanıldı. Agar dilüsyon çalışmaları için hazırlanan antibiyotikli besiyerleri taze olarak hazırlandı ve plaklar bir gün önceden anaerobik atmosferde inkübe edilerek indirgendi (13,14,22).

Brucella Broth Besiyeri

Brucella Broth (Liofilchem, Italy)	28 g
Vitamin K1 solüsyonu (1 mg/mL)	1 mL
Hemin (5 mg/mL)	1 mL
Sodyum bikarbonat (20 mg/mL)	5 mL
Distile su	1000 mL

Brucella broth, vitamin K1 ve hemin 900 mL distile su içinde eritildi. 15 dakika 121 °C'de steril edildikten sonra üzerine 100 mL steril defibrine at kanı ilave edildi. Buzdolabında (+4 °C) muhafaza edildi (13,23).

KULLANILAN STOK SOLÜSYONLAR

Vitamin K1 Stok Solüsyonu (10 mg/mL)

Vitamin K1 (Sigma-Aldrich Co.)	0,2 mL
%95'lik Etanol	20 mL

0.2 mL vitamin K1, 20 mL etanol içinde çözüldü. Besiyeri içerisinde, final konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde eklenerek kullanıldı. Bunun için 0.1 mL vitamin K1 stok solüsyonu 9 mL distile suya ilave edildi. Brucella broth besiyeri için bu çözeltilerden kullanıldı. Hazırlanan çözeltiler buzdolabında (+4 °C) muhafaza edildi (13,23).

Hemin Stok Solüsyonu

Hemin (Sigma-Aldrich Co.)	0,1 g
Sodyum hidroksit (1N)	2 mL
Distile su	18 mL

0,1 gram hemin 2 mL 1N sodyum hidroksit içerisinde çözüldü. Toplam hacim 20 ml olacak şekilde üzerine distile su ilave edildi. 15 dakika 121 °C'de steril edildikten sonra buzdolabında (+4 °C) muhafaza edildi. Besiyeri içerisinde, final konsantrasyonu 5 µg/mL olacak şekilde eklenerek kullanıldı (13,23).

Sodyum Bikarbonat Stok Solüsyonu (20 mg/mL)

2 gram sodyum bikarbonat 100 mL distile su içerisinde çözüldü (13,23).

İZOLE EDİLEN MİKROORGANİZMALARIN TANIMLANMASI

Çalışmaya, çeşitli kliniklerden anaerop kültür isteğiyle gönderilen 4 kan kültürü, 5 apse aspirat örneğinden izole edilen *Bacteroides* türleri ve *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 dahil edildi. Klinik örneklerden izole edilen bakterilerin MALDI-TOF MS Bruker Microflex (Bruker Diagnostics, Germany-US) ile 8'i *Bacteroides fragilis*, 1 tanesi *Bacteroides thetaiotaomicron* olarak tanımlandı (Tablo 5). İzole edilen bakteriler -80 °C'de %10'luk skim milk içinde stoklandı.

Tablo 5: Çalışmaya dahil edilen örnekler

ÖRNEK TÜRÜ	BAKTERİ ADI	(n)
Kan	<i>Bacteroides fragilis</i>	4
Apsel aspirat	<i>Bacteroides fragilis</i>	4
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1
ATCC 25285	<i>Bacteroides fragilis</i>	1
TOPLAM		10

Duyarlılık çalışmalarından önce, -80 °C’de stoklanan anaerop bakterilerin, zenginleştirilmiş brucella agara (Liofilchem, Italy) pasajı yapıldı. 37 °C anerobik atmosferde’de 48 saat inkübe edildikten sonra subkültüre alınarak saflık kontrolü yapıldı. 37 °C anerobik atmosferde 48 saat inkübe edildikten sonra, subkültüre alınan bakteri kolonilerinin MALDI-TOF MS ile tekrardan tanımlamaları yapıldı.

İZOLE EDİLEN ANAEROP BAKTERİLERİN ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİNDE KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER

Çalışmada izole edilen bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarını belirlemek için kloramfenikol (Galenik Chemical Corp., Turkey), metronidazol (Sigma-Aldrich, USA), penisilin G (Biological Industries-Israel), klindamisin (Sigma-Aldrich, USA), meropenem (Sigma-Aldrich, USA), amoksisilin (Sigma-Aldrich, USA), potasyum klavulanat (Sigma-Aldrich, USA) antibiyotik tozları kullanıldı.

Antimikrobiyal duyarlılık yöntemi olarak CLSI’nın (M11-A6) referans yöntem olarak kabul ettiği agar dilüsyon yöntemi kullanıldı (14). Antimikrobiyal duyarlılık test sistemlerinin değerlendirilmesinde referans yönteme ilave olarak ikinci bir yöntem kullanılması önerildiğinden, agar dilüsyonun yanı sıra E-test yöntemi kullanıldı (13). Her iki yönteminin sonuçları karşılaştırıldığında, tutarsız olduğu görülen sonuçlar tekrar edildi.

AGAR DİLÜSYON İÇİN STOK İLAÇ KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

Stok antibiyotik konsantrasyonları 5120 µg/ml olacak şekilde,

$$\text{Hacim(mL)} = \frac{\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Konsantrasyon}(\mu\text{g/mL})}{\text{Potens} (\mu\text{g/mg})}$$

formülü kullanılarak hesaplandı. Metronidazolün ana stoğu, içerisindeki DMSO’nun agar plağındaki final konsantrasyonu %1’i geçmeyecek şekilde hazırlandı. Kloramfenikol %95 etanol içerisinde çözülürken, ilacın çözüldüğü en düşük etanol miktarı kullanıldı. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılan antibiyotik tozları CLSI’nın M100-S25’de önerdiği doğrultuda hazırlandı (24). Çalışmada kullanılan antibiyotikler için kullanılan uygun çözücü ve sulandırıcılar Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6: Antibiyotik tozları için kullanılan çözücü ve sulandırıcılar (24)

Antimikrobiyal Madde	Kullanılan Çözücü	Sulandırıcı
1. Amoksisilin	Fosfat tamponu pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu pH 6.0, 0.1 mol/L
2. Potasyum Klavulanat	Fosfat tamponu pH 6.0, 0.1 mol/L	Fosfat tamponu pH 6.0, 0.1 mol/L
3. Klindamisin	Su	Su
4. Kloramfenikol	%95 etanol	Su
5. Metronidazol	DMSO	Su
6. Meropenem	Su	Su
7. Penisilin	Su	Su

AGAR DİLÜSYON İÇİN İNOKÜLUM SÜSPANSİYONUNUN HAZIRLANMASI

Bakteri inokülasyonu agar plağındaki her ekim alanında 1×10^5 CFU/mL olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan süspansiyonlar 15 dakika içinde kullanıldı. 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) olarak hazırlanan standart bakteri süspansiyonundan 1 μ L'lik damlatma yapılarak, ekim alanında 1×10^5 CFU/mL bakteri yoğunluğu elde edildi. (6,13,14).

AGAR DİLÜSYON PLAKLARININ İNKÜBASYONU

İnokülasyonu yapılan agar plakları 37 °C'de anaerobik atmosfer (%5-10 H₂, %5-10 CO₂, %80-90 N₂) sağlayan anaerobik kabinde 42-48 saat inkübe edildi.

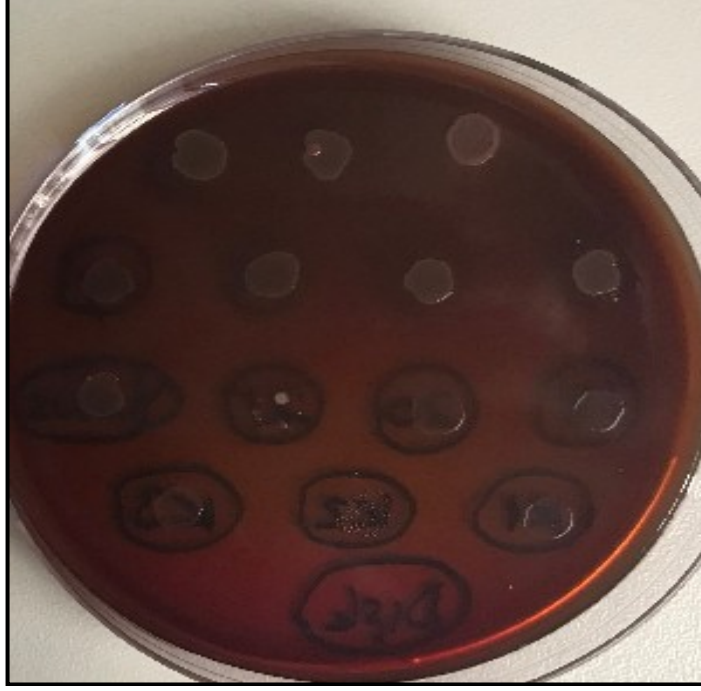
AGAR DİLÜSYON SON NOKTALARININ BELİRLENMESİ

48 saatlik inkübasyon sonunda agar plaklarında üremeyi inhibe eden son konsantrasyon MİK olarak belirlenir. Tek bir koloni üremesi veya inokülasyonun neden olduğu üreme benzeri iz dikkate alınmadı. Bu nedenle kontrol plağına göre üremenin %80 veya daha fazla azaldığı gözlenen konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi (13). Şüpheli görülen koloniler, saflık kontrolü için MALDI-TOF MS ile tekrardan tanımlandı.

AGAR DİLÜSYON İÇİN ÜREME KONTROLÜ

İçerisinde antimikrobiyal madde içermeyen zenginleştirilmiş brucella agar plakları üreme kontrolü olarak kullanıldı (13) (Şekil 1). Üreme olmayan bakteri kolonileri için test geçersiz kabul edilerek tekrar edildi.

Şekil 1: Agar dilüsyon üreme kontrolü



İZOLE EDİLEN ANAEROP BAKTERİLERİN ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARININ E-TEST YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

E-Test Yöntemi İçin İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanması

Zenginleştirilmiş brucella broth içerisinde 1 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ CFU/mL) olarak hazırlanan standart bakteri süspansiyonları steril eküvyon ile brucella kanlı agar plaklarına inoküle edildi. Bakteri inoküle edilen plaklara test stripleri yerleştirildi. Hazırlanan süspansiyonlar 15 dakika içinde kullanıldı (13).

E-Test Plaklarının İnkübasyonu

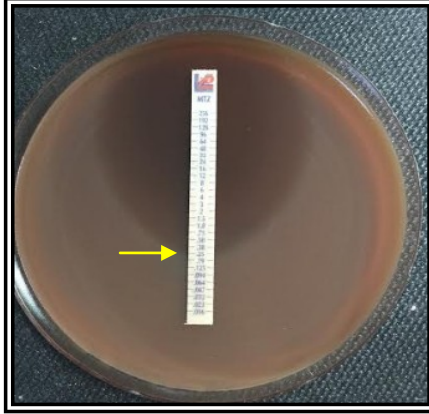
İnokülasyonu yapılan agar plakları 37 °C’de anaerobik atmosfer (%5-10 H₂, %5-10 CO₂, %80-90 N₂) sağlayan anaerobik kabinde 42-48 saat inkübe edildi.

Duyarlılık çalışmalarında plaklar bir gün önceden anaerobik atmosferde inkübe edilerek indirgendi (6).

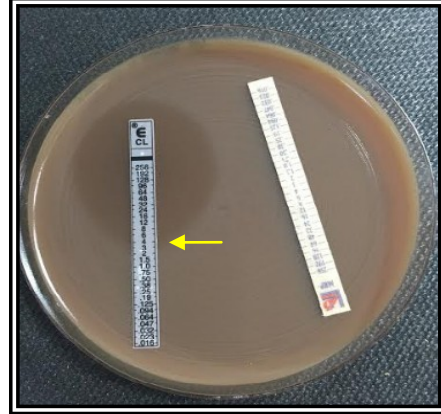
MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyonları) Belirlenmesi

Agar plağı üzerinde 24-48 saatlik inkübasyon sonunda eliptik bir inhibisyon zonu oluşur. Oluşan bu elips ile E test stribinin kesişme noktası MİK değeri kabul edildi (Şekil 2). İnhibisyon zonlarının iki farklı dilüsyonu göstermesi halinde, yüksek dilüsyon değeri MİK olarak kabul edildi (13).

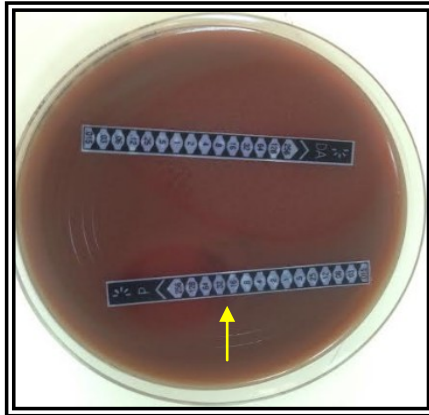
Şekil 2: E test yöntemi ile *Bacteroides* türlerinde antimikrobiyal duyarlılığın tespiti



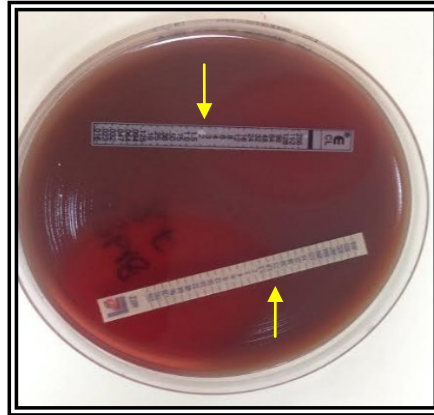
Metronidazol/MİK: 0.25 µg/mL



Kloramfenikol/MİK: 3.0 µg/mL
Meropenem/MİK: > 256 µg/mL



Klindamisin/MİK: > 256 µg/mL
Penisilin/MİK: 16 µg/mL



Metronidazol/MİK: 0.75 µg/mL
Kloramfenikol/MİK: 3.0 µg/mL

AKIM SİTOMETRİ ANALİZİ İÇİN BAKTERİ HÜCRELERİNİN HAZIRLANMASI

Hücre süspansiyonları için 24 saatlik taze pasajlanmış bakteri kolonileri kullanıldı. 1-2 bakteri kolonisi öze ile alınarak, vitamin K1 ve hemin ile zenginleştirilmiş brucella broth'da anaerobik atmosferde 1 saat inkübe edilerek ekspanansiyel faza (logaritmik faz) gelmesi sağlandı. Bakteri hücreleri optik dansitesi (OD) 0,2 (600 nm) olacak şekilde antibiyotiklerin EUCAST'de belirtilen klinik sınır değer konsantrasyonları ile muamele edildi (Tablo 7) (13,25-27). İstenen optik dansite sağlanmadığı durumda 24 saatlik taze kültürden 0,5 McFarland standart inokulum bulanıklığı sağlanarak bakteriler çalışmaya alındı (13). Bakterilerin logaritmik üreme fazını atlamamak için, bakterilerin antimikrobiyallerle inkübasyon süresi 2 saati geçirilmedi (16).

Antibiyotikli bakteri süspansiyonları, anaerop bakterilerde duyarlılık test yöntemleri arasında yer alan sıvı dilüsyon (makrodilüsyon) yöntemi kullanılarak hazırlandı. Bakteri süspansiyonlarının final antibiyotik konsantrasyonları penisilin için 0,25 µg/mL, amoksisilin-klavulanik asit için 4/2 µg/mL, meropenem için 4 µg/mL, kloramfenikol için 8 µg/mL, metronidazol için 4 µg/mL, klindamisin için 4 µg/mL olacak şekilde hazırlandı.

Tablo 7: Kullanılan antibiyotiklerin klinik sınır değerleri (EUCAST)

Kullanılan Antibiyotikler	Klinik sınır değer (µg/mL)
Penisilin G (PG)	0,25-0,5
Amoksisilin-Klavulanik Asit (AMC)	4,0-8,0
Meropenem (MEM)	2,0-8,0
Metronidazol (MT)	4,0
Kloramfenikol (C)	8,0
Klindamisin (DA)	4,0

Akım sitometri yöntemi ile antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarına başlarken ilk olarak bir bakteriostatik (klindamisin) ve bir bakterisidal (meropenem) antimikrobiyal seçildi. Seçilen iki antibiyotiğin seri dilüsyonları hazırlandı.

Ekspanansiyel fazdaki *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 suşu, klindamisin ve meropenemin seri dilüsyonları ile 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 4 saat olmak üzere anaerobik atmosferde muamele edildi (25,28). Her bir saat diliminin sonunda

antibiyotik etkisi altındaki hücrelerin PI boyanma oranları analiz edildi (Tablo 8 ve Tablo 9) ve canlı/ölü hücre ayrımı yapıldı (26,27,29)

Tablo 8: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, meropenemin seri dilüsyonları ile 1, 2, 3 ve 4 saatlik inkübasyon sonundaki PI boyanma oranları (%)

Meropenem (4.0 µg/mL)				
Dilüsyon oranı (µg/mL)	PI (%)			
	1 saatlik inkübasyon	2 saatlik inkübasyon	3 saatlik inkübasyon	4 saatlik inkübasyon
4	60,13	65,22	65,53	57,45
2	64,50	68,33	39,15	48,27
1	24,57	26,25	20,08	20,89
0,5	19,33	20,68	20,66	12,56
0,25	13,29	15,43	16,90	5,19
0,125	7,33	8,48	9,20	5,37
0,0625	0,58	5,83	6,18	3,22
0,0312	1,15	1,77	3,28	3,0
0,015	1,26	3,81	3,0	1,82

Tablo 9: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, klindamisin seri dilüsyonları ile 1, 2, 3 ve 4 saatlik inkübasyon sonundaki PI boyanma oranları (%)

Klindamisin (4,0 µg/mL)				
Dilüsyon oranı (µg/mL)	PI (%)			
	1 saatlik inkübasyon	2 saatlik inkübasyon	3 saatlik inkübasyon	4 saatlik inkübasyon
16	40,02	48,22	55,65	49,80
8	56,67	62,27	53,18	67,58
4	42,58	45,92	42,26	47,36
2	25,98	31,19	10,76	27,07
1	16,87	18,34	7,87	13,13
0,5	7,72	9,34	3,21	8,25
0,25	5,07	6,09	2,20	7,87
0,125	2,24	2,86	2,3	3,56
0,0625	1,03	1,75	1,47	1,70

Her bir saatin sonunda yapılan akım sitometri analizlerinde, hücrelerin PI ile boyanma oranları birbirine yakın olarak tespit edildi.

Çalışmada anaerop bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarının hızlı olarak tespit edilmesi amacı ile, antibiyotikli bakteri hücre süspansiyonları 1 saat klinik sınır değer konsantrasyonundaki antimikrobiyallerle muamele edilerek çalışma protokolü oluşturuldu.

Akım sitometri analizi için antibiyotikli bakteri süspansiyonları, CLSI'nın anaerop bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında referans olarak gösterdiği tüpte dilüsyon (makrodilüsyon) yöntemi kullanılarak hazırlandı (Tablo 10) (13).

Tablo 10: Akım sitometri analizi için bakteri hücrelerinin hazırlanması

Bakteri süspansiyonları 1,5 mL'lik ependorf tüplerin içinde hazırlandı. Toplam hacim 1000 µL (1 mL)	
250 µL brucella broth:	Antibiyotik çözeltisinin ilavesiyle 1:2 dilüe olacağından, besiyeri konsantrasyonu 2 kat hazırlanarak kullanıldı.
250 µL antibiyotik stok çözeltisi:	Toplam hacim içerisinde 1:4 dilüe olacağından, istenilen konsantrasyonun 4 katı kullanılmıştır. (Örneğin klinik sınır değeri 8 µg/mL olan kloramfenikol için ependorf tüpüne 32 µg/mL konsantrasyonda antibiyotik ilave edildi.)
500 µL bakteri:	0,5 McFarland (1×10^8 bakteri/mL) standart bulanıklıktaki süspansiyon 1:10 dilüe edilerek kullanıldı. Böylece son bakteri konsantrasyonu 5×10^6 hücre/mL oldu. İnokulum saflığını kontrol etmek için agar plaklarına hazırlanan süspansiyonlardan tekrar ekim yapılarak anaerobik atmosferde inkübe edildi.

AKIM SİTOMETRİ ANALİZİ İÇİN KULLANILAN BOYALAR VE HÜCRELERİN BOYANMASI

Belirli konsantrasyonlardaki antibiyotiklerle muamele edilen bakteri süspansiyonları TO (Sigma Co.) ve PI (Serva Co.) boya ile boyandı. Üritici firmanın talimatları doğrultusunda TO metanol içinde çözülürken, PI steril distile suda çözüldü. Liyofilize olarak temin edilen boyalardan TO 420 nM, PI 48 µM olarak hazırlandı (27,29). Hücre geçirgen TO floresan boyası ile antibiyotik etkisi altındaki tüm bakteri popülasyonu boyanırken, PI floresan boyası ile sadece antibiyotik etkisi altında kalarak hücre membran potansiyeli bozulmuş olan hücreler boyandı.

Özellikle gram negatif bakterilerin dış membranlarındaki kalın lipit tabakasından dolayı kullanılan boyaların hücre içine etkin bir şekilde alınması için Tween 20 ve EDTA kullanıldı (19,27,29,30). 170 µl PBS içine 2 µl %1'lik Tween 20, 4 µl 50 mM'lık EDTA ve 20 µl antibiyotikli bakteri süspansiyonu ilave edildi, 10 dakika oda ısısında bekletildi. İkinci aşama olarak 2 µl 420 nM TO boyasından eklenip 10 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi. Son aşama olarak 2 µl 48 µM PI boyasından eklenip 5 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi ve analiz yapıldı.

Çalışma esnasında anaerop bakterilerin atmosferik oksijenden etkilenmediğini görmek için, antibiyotiksiz bakteri süspansiyonları TO ve PI boya ile boyanıp kontrol analizi olarak çalışıldı.

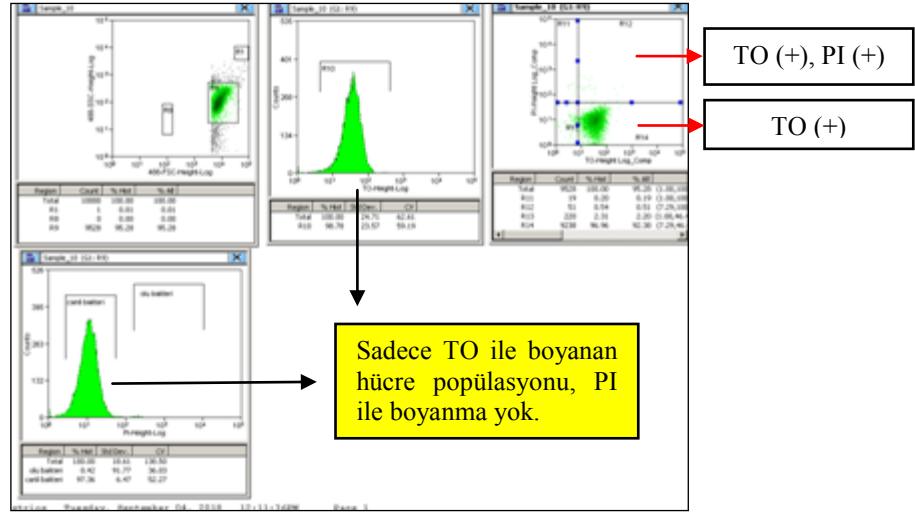
HÜCRELERİN AKIM SİTOMETRİ İLE ANALİZİ

Akım sitometri analizi için 'MoFlo Astrios Flow Cytometer System (Beckman Coulter Co.)' cihazı kullanıldı. Her okumada 10.000 hücre analiz edildi (26,30). Analiz esnasında bakteri hücresi dışında kalan partikülleri elimine etmek için eşik değeri (threshold) % 4 kullanıldı. Hücrelerin eksitasyonu için 488 nm dalga boyunda lazer kullanıldı. Hücre emisyonunda; TO için FL1 kanalında (530 nm), PI için ise FL3 kanalında (617 nm) okuma yapıldı.

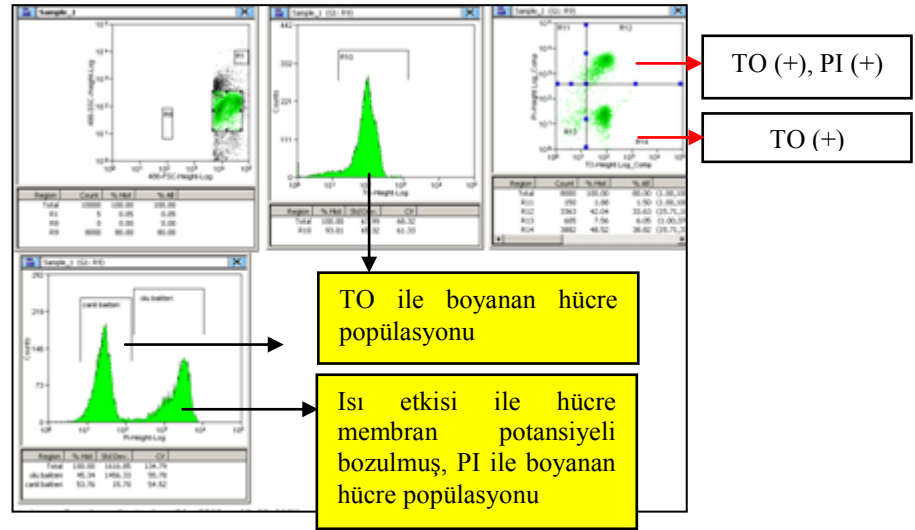
Referans suş kullanılarak, belirli konsantrasyonlarda kullanılan boyaların etkinliği kontrol edildi. Bunun için antibiyotiksiz, hücre duvar bütünlüğü bozulmamış taze bakteri kolonileri ve ısı etkisi ile (100 °C'de 10 dakika) hücre duvar bütünlüğü bozulmuş olan bakteri süspansiyonları TO ve PI ile boyandı (25). Antibiyotiksiz tüm bakteri popülasyonu hücre geçirgen TO boyası ile boyandı. Isı etkisi altında kalarak hücre membran potansiyeli bozulan hücre popülasyonu hücre geçirgen ve geçirgen olmayan her iki floresan boyası ile boyandı (Şekil 3 ve 4).

Her bir hücrenin doğal yapısından kaynaklanan ve çalışmayı etkileyecek düzeyde otofloresan ışımının olup olmadığını kontrol edildi (17). Bunun için antibiyotiksiz boyanmamış taze bakteri süspansiyonları akım sitometri ile analiz edildi. Analiz sonrasında, akım sitometri çalışmalarını etkileyecek düzeyde otofloresan ışımaya görülmedi (Şekil 5).

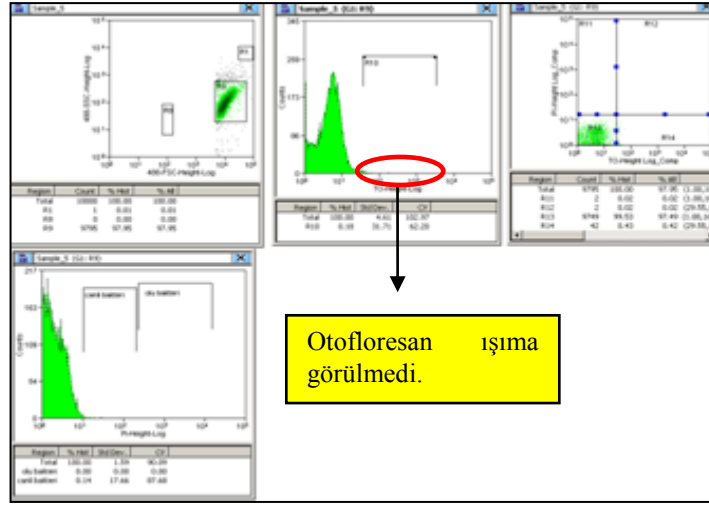
Şekil 3: Antibiyotiksiz TO ve PI ile boyanmış *B. fragilis* ATCC 25285



Şekil 4: Isı etkisi ile hücre duvarı parçalanarak TO ve PI ile boyanmış *B. fragilis* ATCC 25285



Şekil 5: Antibiyotiksiz boyanmamış hücre popülasyonu



BACTEROIDES TÜRLERİNDE ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIĞIN AKIM SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE TEPİTİNDE KLİNİK SINIR DEĞER HESAPLANMASI

Akım sitometri ile yapılan antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında, bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıkları için standardize edilmiş bir sınır değeri yoktur. Çalışmada bu klinik sınır değerinin belirlenmesi için SPSS 21 programı kullanılarak ROC analizi yapıldı. ROC analizi ilk olarak 2. Dünya Savaşı sırasında radar sinyallerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Özellikle tanı testlerinin değerlendirilmesinde, uygulanan testin ayırt edici gücünü değerlendiren bir analiz yöntemidir. ROC eğrilerinde farklı kesim noktaları (cut-off değeri) için farklı duyarlılık ve özgüllük değerleri hesaplanır (31,32).

ROC analizinde, agar dilüsyon yöntemine göre antimikrobiyallere duyarlı bulunan bakteriler, hücre membran potansiyeli bozulmuş hücreler; dirençli bulunan bakteriler ise, hücre membran potansiyeli bozulmamış hücreler olarak kabul edildi. Antibiyotik içermeyen bakteri hücreleri, aynı zamanda hücre membran potansiyeli bozulmamış hücreler olduğundan, bu hücrelerin akım sitometri ile yapılan analiz sonuçları istatistiksel değerlendirmeye dahil edildi (Tablo 11 ve 12).

Tablo 11: Hücrelerin TO ve PI bağlanma oranları (%)

İzolasyon no	Antibiyotiksiz boyanma oranları		Meropenem (4 µg/mL)		Kloramfenikol (8 µg/mL)		Metronidazol (4 µg/mL)		Amoksisilin-Klavulanik asit (4/2 µg/mL)		Klindamisin (4 µg/mL)		Penisilin G (0.25µg/mL)	
	TO (%)	PI (%)	TO (%)	PI (%)	TO (%)	PI (%)	TO (%)	PI (%)	TO (%)	PI (%)	TO (%)	PI (%)	TO (%)	PI (%)
1	89,51	2,56 ^a	91,47	76,72	86,80	32,34	90,27	50,62	85,02	63,69	85,22	63,69	95,94	7,10 ^b
2	89,67	3,21 ^a	71,07	64,01	89,68	44,26	53,63	76,75	98,01	42,87	98,49	64,79	50,75	3,98 ^b
3	97,93	1,95 ^a	98,84	77,69	98,92	55,01	97,95	42,69	97,32	52,77	95,24	19,08 ^b	97,53	9,63 ^b
4	88,4	1,95 ^a	92,17	63,85	96,45	50,68	72,51	60,28	94,80	29,39 ^b	98,10	41,40	95,44	1,77 ^b
5	95,85	2,03 ^a	90,78	45,98	95,88	58,93	95,14	36,20	96,16	41,71	97,41	60,46	97,61	2,83 ^b
6	87,76	1,90 ^a	71,18	73,37	89,06	63,47	92,51	99,10	85,99	74,52	67,96	77,81	97,08	1,05 ^b
7	88,37	2,71 ^a	79,63	7,42 ^b	93,27	75,01	90,74	92,32	95,04	14,31 ^b	94,24	18,08 ^b	98,04	12,07 ^b
8	95,25	1,71 ^a	91,27	58,32	90,56	82,38	92,18	86,22	78,24	81,08	96,97	59,83	92,91	8,49 ^b
9	78,70	2,05 ^a	95,40	3,74 ^b	96,46	80,54	96,26	82,08	93,61	1,90 ^b	96,27	87,25	95,43	9,16 ^b
10	92,80	1,66 ^a	89,93	72,37	42,80	65,12	66,46	55,61	67,61	36,22	98,24	44,64	66,43	2,08 ^b

a. Membran potansiyeli bozulmamış antibiyotiksiz hücreler ve PI (%) ile boyanma oranları

b. Agar dilüsyon yöntemi ile dirençli tespit edilen bakteriler ve PI (%) ile boyanma oranları

Tablo 12: İstatistiksel analize dahil edilen hücreler

Antibiyotik	Agar dilüsyon testi ile duyarlı ve dirençli tespit edilen bakteriler (n)		
	1	Duyarlı	8
Meropenem	2	Dirençli	2
	1	Duyarlı	10
Metronidazol	2	Dirençli	0
	1	Duyarlı	0
Penisilin G	2	Dirençli	10
	1	Duyarlı	7
Amoksisilin-Klavulanik Asit	2	Dirençli	3
	1	Duyarlı	8
Klindamisin	2	Dirençli	2
	1	Duyarlı	10
Kloramfenikol	2	Dirençli	0
	2		10
Hücre membran potansiyeli bozulmamış antibiyotiksiz kontrol grubu	2		10
TOPLAM	1		43
	2		27

1. Antibiyotik etkisi altında hücre membran potansiyeli bozulmuş (antibiyotiğe duyarlı) hücreler

2. Antibiyotik etkisi altında hücre membran potansiyeli bozulmamış (antibiyotiğe dirençli) hücreler ve membran potansiyeli bozulmamış antibiyotiksiz hücreler (kontrol grubu)

ROC analizi ile çalışmada kullanılan tüm 6 antibiyotik için farklı duyarlılık ve özgülükte ortak klinik sınır değeri (break point) hesaplandı. Klinik break point değerleri meropenem, amoksisilin klavulanik asit ve klindamisin için ayrı olarak hesaplandı. Ayrıca, çalışmadaki her bir antibiyotik grubu (bakterisidaller ve bakteriostatikler) için farklı duyarlılık ve özgülükte ortak cut-off değerleri hesaplandı (Tablo 13). Penisilin duyarlı ve metronidazol dirençli klinik izolat tespit edilmediğinden, bu iki antibiyotik için klinik sınır değeri hesaplanmadı.

Tablo 13: Antimikrobiyaller için hesaplanan farklı duyarlılık ve özgüllükte klinik sınır değerleri

Tüm antibiyotikler için hesaplanan ortak klinik sınır değerleri			Antibiyotik Grubu	Klinik sınır değerleri	Duyarlılık	1 – Özgüllük	
Klinik sınır değerleri	Duyarlılık	1- Özgüllük					
,0500	1,000	1,000	MEM	2,7400	1,000	1,000	
1,3550	1,000	,963		5,5800	1,000	,500	
1,6850	1,000	,926		26,700	1,000	0,000	
1,7400	1,000	,889		52,150	,875	0,000	
1,8350	1,000	,852		61,085	,750	0,000	
1,9250	1,000	,778		63,930	,625	0,000	
1,9900	1,000	,704		68,190	,500	0,000	
2,0400	1,000	,667		72,870	,375	0,000	
2,0650	1,000	,630		75,045	,250	0,000	
2,3200	1,000	,593		77,205	,125	0,000	
2,6350	1,000	,556		78,690	0,000	0,000	
2,7700	1,000	,519		AMC	,9000	1,000	1,000
3,0200	1,000	,481			8,1050	1,000	,667
3,4750	1,000	,444			21,850	1,000	,333
3,8600	1,000	,407			35,550	1,000	0,000
5,5400	1,000	,370			42,290	,857	0,000
7,2600	1,000	,333			43,755	,714	0,000
7,9550	1,000	,296			48,705	,571	0,000
8,8250	1,000	,259	58,230		,429	0,000	
9,3950	1,000	,222	69,105		,286	0,000	
10,8500	1,000	,185	77,800		,143	0,000	
13,1900	1,000	,148	82,080	0,000	0,000		
16,1950	1,000	,111	DA	17,080	1,000	1,000	
18,5800	1,000	,074		18,580	1,000	,500	
24,2350	1,000	,037		30,240	1,000	0,000	
30,8650	1,000	0,000		43,020	,875	0,000	
33,2800	,977	0,000		52,235	,750	0,000	
35,2100	,953	0,000		60,145	,625	0,000	
38,8000	,930	0,000		62,075	,500	0,000	
41,5550	,907	0,000		64,240	,375	0,000	
42,2000	,884	0,000		71,300	,250	0,000	
42,7800	,860	0,000		82,530	,125	0,000	

BULGULAR

Rutin anaerop kültür isteğiyle gönderilen kan kültürü (n=4) ve apse aspirat (n=5) örneklerinden izole edilmiş olan anaerop bakterilerin MALDI TOF MS ile tanımlanması yapıldı. Kan kültürlerinden izole edilen anaerop bakteriler *Bacteroides fragilis* (n=4) olarak tanımlandı. Apsel aspirat örneklerinden izole edilen anaerop bakterilerden 4'ü *Bacteroides fragilis* olarak tanımlanırken, 1 izolat *Bacteroides thetaiotaomicron* olarak tanımlandı. Örneklerin klinik dağılımı tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14: Çalışmaya dahil edilen bakteriler ve örneklerin klinik dağılımı

ÖRNEK TÜRÜ	KLİNİK (n)	BAKTERİ ADI	(n)
Kan	Anestezi Yoğun Bakım (1)	<i>Bacteroides fragilis</i>	4
	Palyatif Kliniği (1)		
	Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği (1)		
	Yoğun Bakım Kliniği (1)		
Apsel aspirat	Beyin Cerrahisi Kliniği (1)	<i>Bacteroides fragilis</i>	4
	Genel Cerrahi Kliniği (3)		
	Acil Erişkin (1)	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285			1
TOPLAM			10

İzole edilen izolatların antimikrobiyal duyarlılıkları agar dilüsyon yöntemi ve E-test yöntemi ile tespit edildi. Antimikrobiyal duyarlılık çalışmasında 6 farklı antibiyotik (penisilin G, amoksisilin-klavulanik asit, meropenem, klindamisin, kloramfenikol, metronidazol) kullanıldı. Bakterilerin duyarlılık sonuçları Tablo 15 ve 16'da verilmiştir.

Tablo 15: *Bacteroides* türlerinin agar dilüsyon duyarlılık test sonuçları

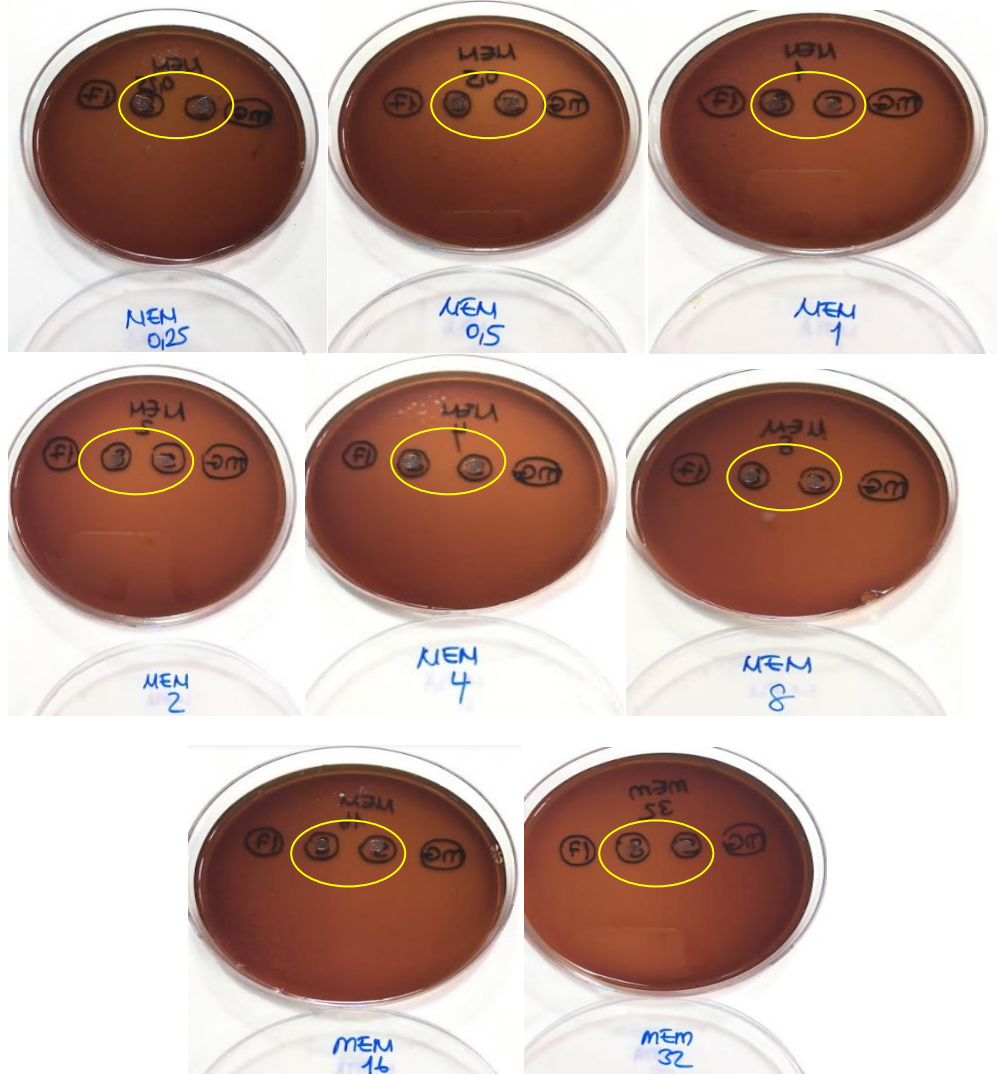
Bakteri adı	Antibiyotik	MİK (µg/mL) Agar dilüsyon (n)	Klinik sınır değer (µg/mL)	<i>B.fragilis</i> ATCC 25285
<i>B.fragilis</i> ATCC 25285	Meropenem	<0,125	2-8	0,03-0,25
	Kloramfenikol	4,0	8	2-8
	Metronidazol	0,25	4	0,25-1
	Amoks-klav	2/1	4-8	0,25/0,125-1/0,5
	Klindamisin	0,5	4	0,5-2
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (n:1)	Penisilin G	32	0,25-5	8-32 (16-64)
	Meropenem	0,25	2-8	
	Kloramfenikol	4,0	8	
	Metronidazol	1,0	4	
	Amoks-klav	2/1	4-8	
	Klindamisin	0,25	4	
	Penisilin G	16	0,25-5	
<i>B.fragilis</i> (n:8)	Meropenem	0,125	2-8	
		0,5		
		0,25		
		0,25 (3)		
		>32 (2)		
	Kloramfenikol	4,0 (3)	8	
		2,0 (5)		
	Metronidazol	0,0625	4	
		0,5 (4)		
		2,0		
		1,0 (2)		
	Amoks-klav,	2/1 (2)	4-8	
		0,5/0,25		
		(2)		
		1,0/0,5		
	>32/16			
	16/8			
	16/8			
Klindamisin	0,5 (5)	4		
	1,0			
	32			
Penisilin G	>32 (5)	0,25-5		
	4			
	16 (2)			

Tablo 16: *Bacteroides* türlerinin E test duyarlılık test sonuçları

Bakteri adı	Antibiyotik	MİK (µg/mL) E test (n)	Klinik sınır değer (µg/mL)	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	Meropenem	0,094	2-8	0,03-0,25	
	Kloramfenikol	3,0	8	2-8	
	Metronidazol	0,38	4	0,25-1	
	Amoks-klav	0,5	4-8	0,25/0,125-1/0,5	
	Klindamisin	0,5	4	0,5-2	
	Penisilin G	8	0,25-5	8-32 (16-64)	
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (n:1)	Meropenem	0,19	2-8		
	Kloramfenikol	1,5	8		
	Metronidazol	0,38	4		
	Amoks-klav	0,5	4-8		
	Klindamisin	0,12	4		
	Penisilin G	16	0,25-5		
<i>B. fragilis</i> (n:8)	Meropenem	0,125 (2) >256 (2) 0,38 0,19 0,25 (2)	2-8		
	Kloramfenikol	4,0 (4) 2,0 (3) 3,0	8		
		Metronidazol	0,38 (3) 0,75 (2) 0,50 (2) 4,0	4	
			Amoks-klav,	0,5 (3) 4,0 1,0 32 >256 0,25	4-8
	Klindamisin			32 >32 0,5 (5) 1,0	4
		Penisilin G		32 16 (3) >256 (4)	0,25-5

Çalışmada agar dilüsyon ve E test yöntemine göre tüm *Bacteroides* türleri penisilin G'ye dirençli bulundu. Kloramfenikol ve metronidazol dirençli bakteri saptanmadı. Üç *Bacteroides fragilis* klinik izolatında agar dilüsyon yöntemi ile AMC dirençli bulunurken, E test yöntemi ile sadece iki izolatta AMC dirençli bulundu. Agar dilüsyon yöntemi ile bir *Bacteroides fragilis* izolatında AMC MİK değeri 16/8 µg/mL bulunurken, E test yöntemi ile AMC MİK değeri 4 µg/mL olarak tespit edildi. AMC MİK değerlerindeki bu uyumsuzluktan dolayı her iki duyarlılık testi bu izolat için tekrar edildi. Tekrar edilen agar dilüsyon sonucuna göre, bu bakteri AMC'ye dirençli kabul edildi (MİK: 16/8 µg/mL). İki *Bacteroides fragilis* türünde, hem agar dilüsyon hem de E test yöntemi ile klindamisin direnci saptandı. Her iki yöntemde de iki *Bacteroides fragilis* suşunda yüksek düzey meropenem direnci (MİK>32 µg/mL, MİK>256 µg/mL) tespit edildi (Şekil 6 ve Şekil 7).

Şekil 6: Meropenem dirençli *B.fragilis* (MİK: >32 µg/mL)



Şekil 7: Meropenem dirençli *B.fragilis*

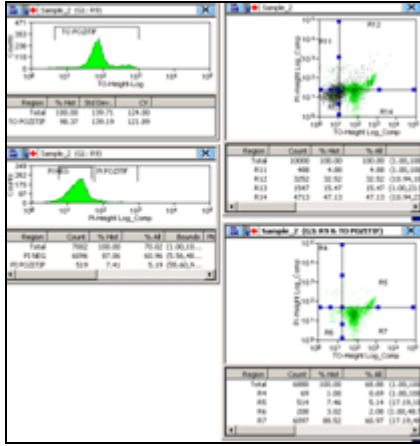


Meropenem/MİK: > 256 µg/mL

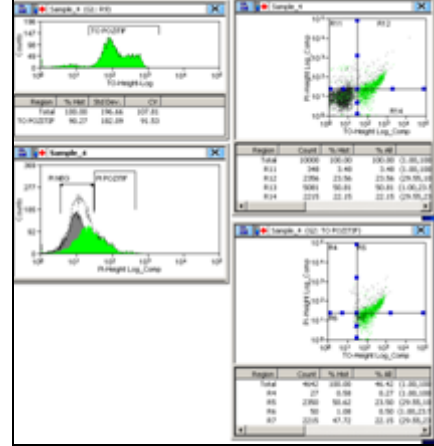
Akım sitometri ile yapılan duyarlılık çalışmaları öncesinde, eksponansiyel fazdaki *B. fragilis* ATCC 25285, kullanılan antibiyotiklerin klinik sınır değer konsantrasyonları (penisilin 0,25 µg/mL, amoksisilin-klavulanik asit 4/2 µg/mL, meropenem 4 µg/mL, kloramfenikol 8 µg/mL, metronidazol 8 µg/mL, klindamisin 4 µg/mL) ile 1 saat anaerobik atmosferde inkübe edildi. Akım sitometri analizi ile elde edilen TO ve PI boyanma sonuçları (%) Şekil 8'de belirtilmiştir.

TO canlı/ölü tüm hücreleri boyarken, PI sadece hücre membran potansiyeli bozulmuş hücreleri boyadı. Agar dilüsyon yöntemi ile penisilin MİK'i 32 µg/mL bulunan *B. fragilis* ATCC 25285 suşunda PI boyanması (%7,10) oldukça düşük bulundu. *B. fragilis* ATCC 25285 suşunda en yüksek PI boyanması %76,72 (meropenem) olarak bulundu.

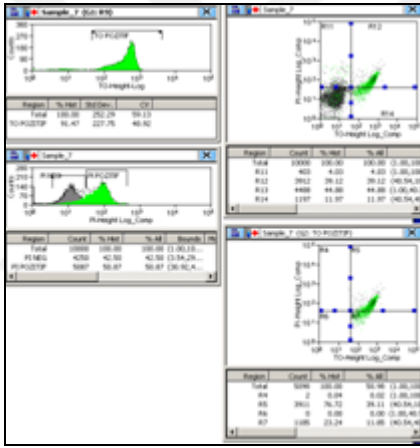
Şekil 8: *B. fragilis* ATCC 25285, antibiyotiklerin klinik sınır değerleri ile muamele sonrası TO ve PI boyanma oranları (%)



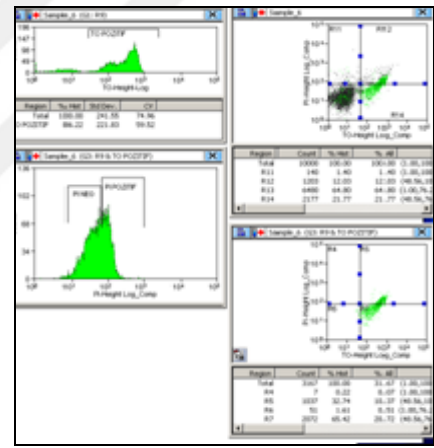
Penisilin G (MİK: 32 µg/mL)
TO: %95,94 -- PI: %7,10



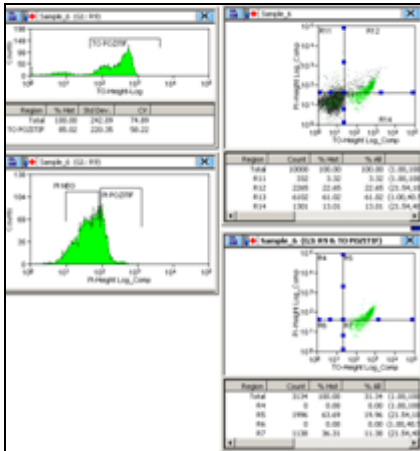
Metronidazol (MİK: 0,25 µg/mL)
TO: %90,27 -- PI: %50,62



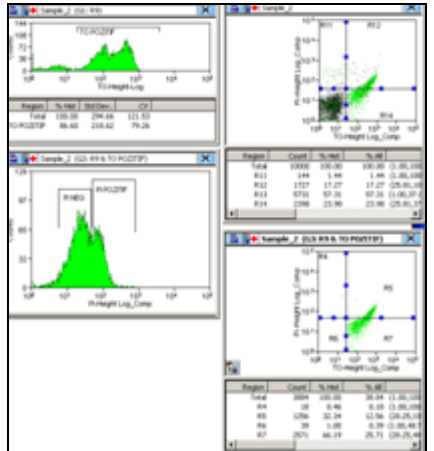
Meropenem (MİK: <0,125 µg/mL)
TO: %91,47 -- PI: %76,72



Klindamisin (MİK: 0,25µg/mL)
TO: %85,22 -- PI: %63,69



Amoksisilin-Klavulanat (MİK: 2/1 µg/mL)
TO: %85,02 -- PI: %63,69



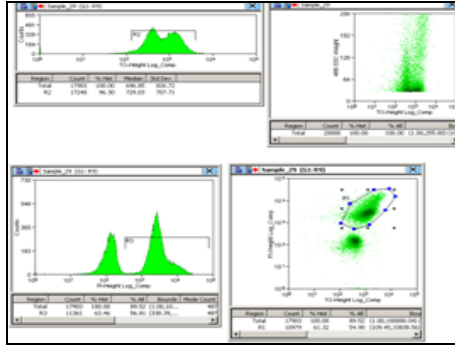
Kloramfenikol (MİK: 4,0 µg/mL)
TO: %86,80 -- PI: %32,34

Standart suş kullanılarak bakteriostatik (klindamisin) ve bakterisidal (meropenem) antibiyotiklerin seri dilüsyonları ile yapılan akım sitometri analizinde, PI bağlanma oranlarının her iki antibiyotiğin klinik sınır değerinden itibaren arttığı tespit edildi (Tablo 17) (Şekil 9 ve 10).

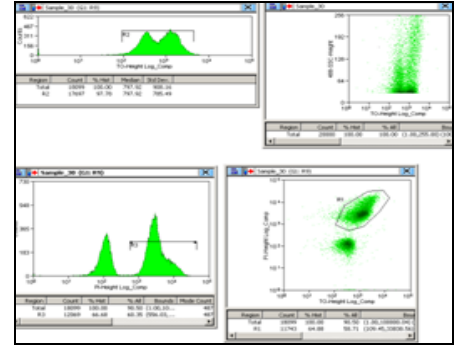
Tablo 17: *B. fragilis* ATCC 25285, meropenem ve klindamisin seri dilüsyonları ile 1 saat muamelesi sonrası TO (%) ve PI (%) ile boyanma oranları

Meropenem (2,0-8,0 µg/mL)			Klindamisin (4,0 µg/mL)		
Dilüsyon (µg/mL)	TO (%)	PI (%)	Dilüsyon (µg/mL)	TO (%)	PI (%)
4	98,33	60,13	16	82,67	40,02
2	98,05	64,50	8	96,94	56,67
1	91,41	14,57	4	97,92	42,58
0,5	98,23	19,33	2	94,10	25,98
0,25	95,33	13,29	1	98,03	16,87
0,125	96,40	7,33	0,5	97,10	7,72
0,0625	99,15	0,58	0,25	99,42	5,07
0,0312	92,75	1,15	0,125	96,89	2,24
0,015	97,60	1,26	0,0625	89,70	1,03

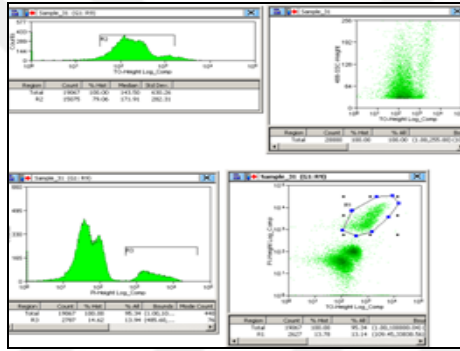
Şekil 9: *B. fragilis* ATCC 25285, meropenem seri dilüsyonları ile yapılan akım sitometri analizi ve TO-PI boyanma oranları (%)



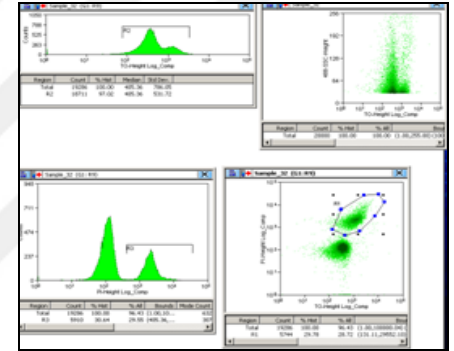
Meropenem 4 µg/mL
TO: %98,3--PI: %60,13



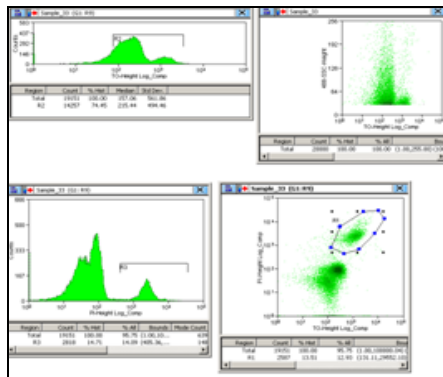
Meropenem 2 µg/mL
TO: %98,05--PI: %64,50



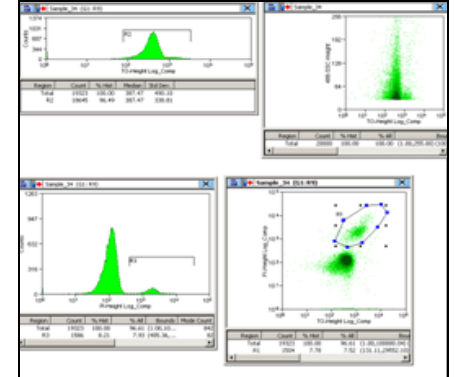
Meropenem 1 µg/mL
TO: %91,4--PI: %14,57



Meropenem 0,5 µg/mL
TO: %98,23--PI: %19,33



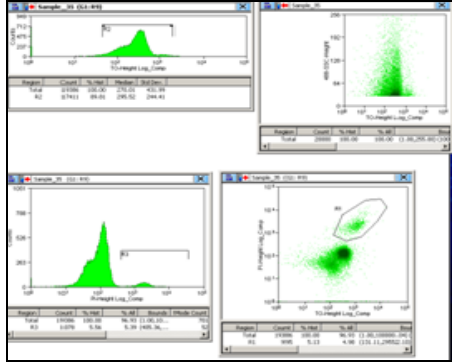
Meropenem 0,25 µg/mL
TO: %95,33--PI: %13,29



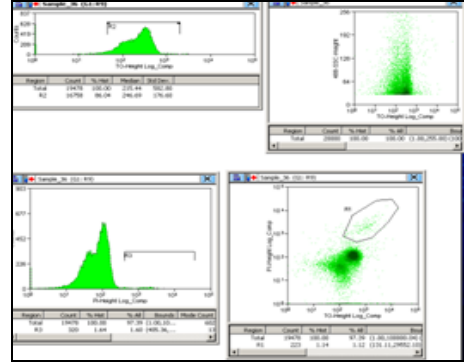
Meropenem 0,125 µg/mL
TO: %96,4--PI: %7,33

(devam ediyor)

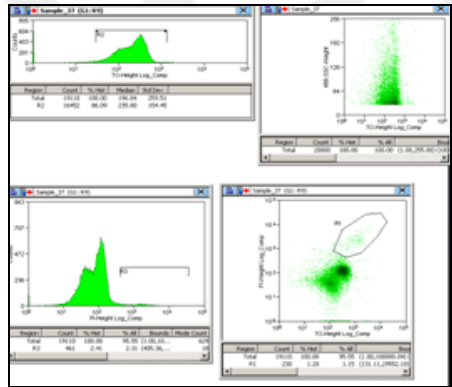
Şekil 9: *B. fragilis* ATCC 25285, meropenem seri dilüsyonları ile yapılan akım sitometri analizi ve TO-PI boyanma oranları (%) (devam ediyor)



Meropenem: 0,0625 µg/mL
TO: %99,15--PI: %0,58

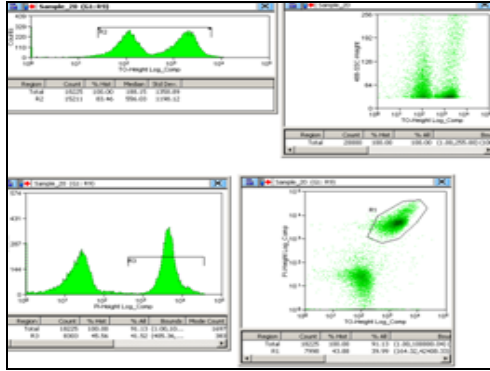


Meropenem: 0,0312µg/mL
TO: %92,75--PI: %1,15

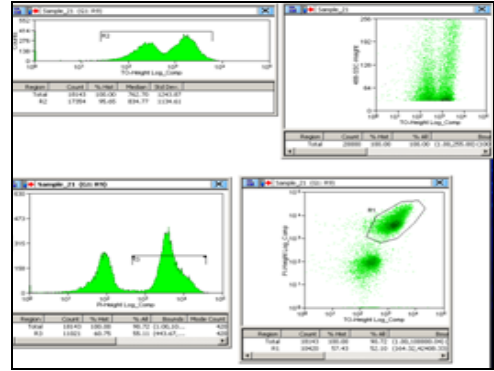


Meropenem: 0,015 µg/mL
TO: %97,60--PI: %1,26

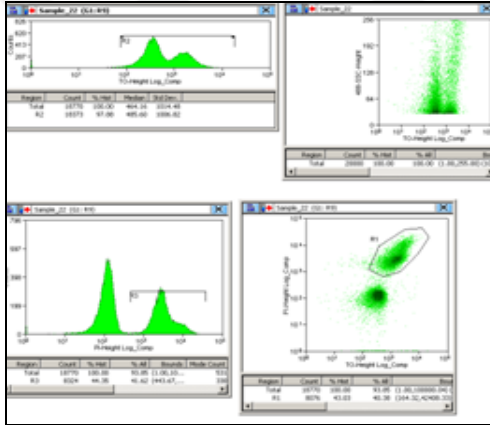
Şekil 10: *B. fragilis* ATCC 25285, klindamisin seri dilüsyonları ile yapılan akım sitometri analizi ve TO-PI boyanma oranları (%)



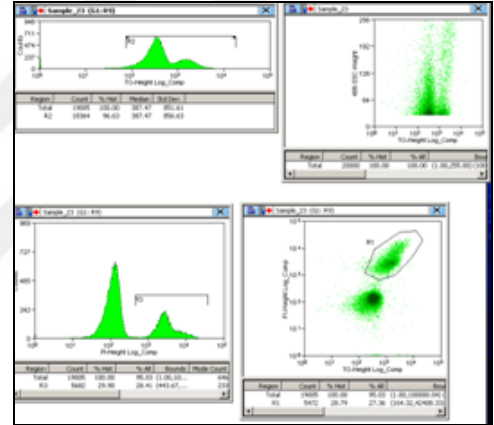
Klindamisin 16 µg/mL
TO: %82,67--PI: %40,02



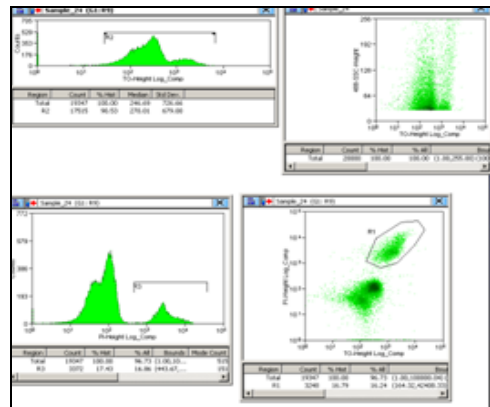
Klindamisin 8 µg/mL
TO: %96,94--PI: %56,67



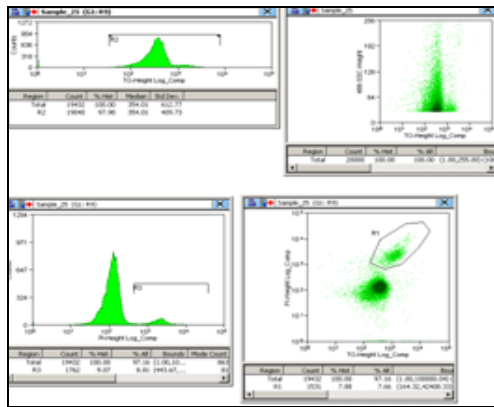
Klindamisin 4 µg/mL
TO: % 97,92--PI: %42,58



Klindamisin 2 µg/mL
TO: %94,10--PI: %25,98



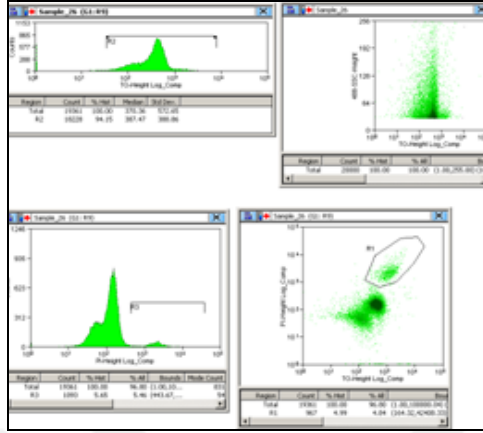
Klindamisin 1 µg/mL
TO: %98,03--PI: %16,87



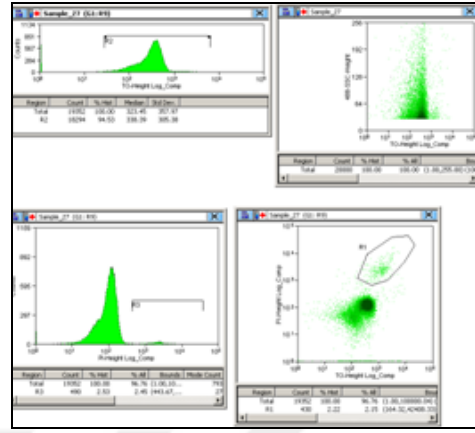
Klindamisin 0,5 µg/mL
TO: %97,10--PI: %7,72

(devam ediyor)

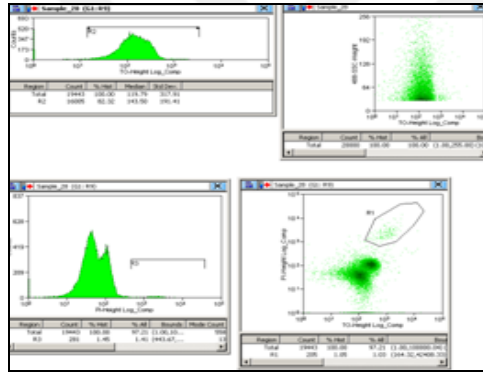
Şekil 10: *B. fragilis* ATCC 25285, klindamisin seri dilüsyonları ile yapılan akım sitometri analizi ve TO-PI boyanma oranları (%) (devam ediyor)



Klindamisin 0,25 µg/mL
TO: %99,42--PI: %5,07



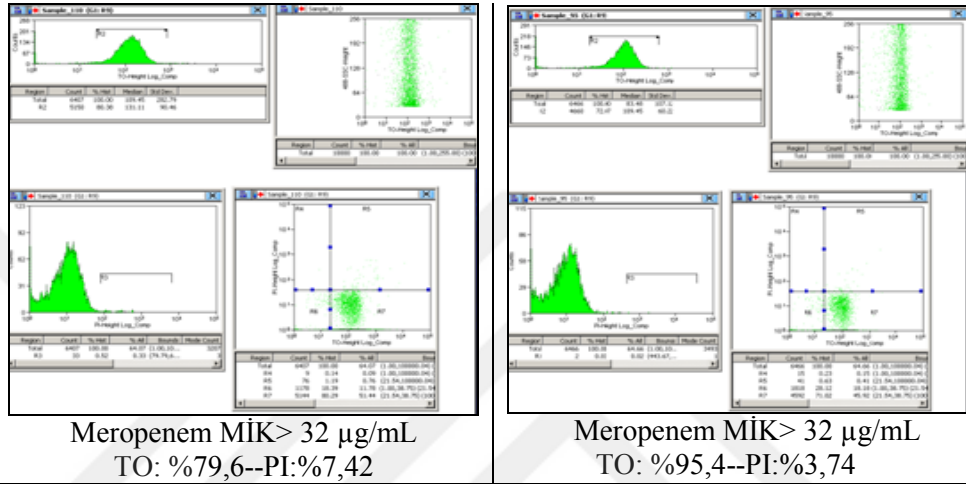
Klindamisin 0,125 µg/mL
TO: %96,89--PI: %2,24



Klindamisin 0,0625 µg/mL
TO: %89,70--PI: %1,03

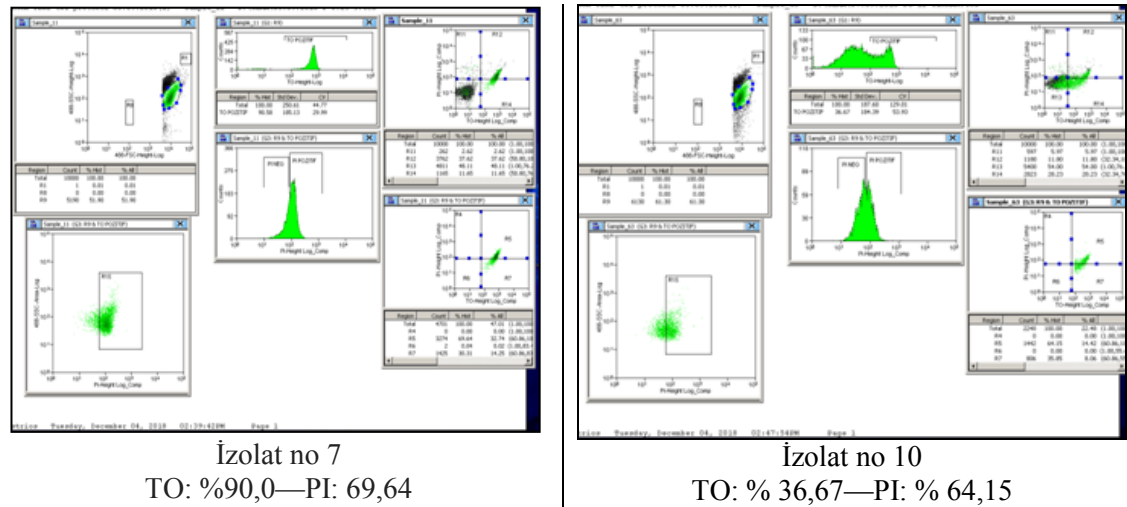
Agar dilüsyon yöntemi ile iki *B.fragilis* türünde yüksek düzey meropenem direnci tespit edildi. Bu bakterilerin 4 µg/mL konsantrasyonundaki meropenem ile 1 saatlik muameleden sonra yapılan akım sitometri analizlerinde, PI boyanma oranları oldukça düşük olarak (%7,42 ve %3,74) tespit edildi (Şekil 11).

Şekil 11: Meropenem dirençli *B.fragilis* izolatlarının akım sitometri ile TO (%) ve PI (%) boyanma görüntüleri



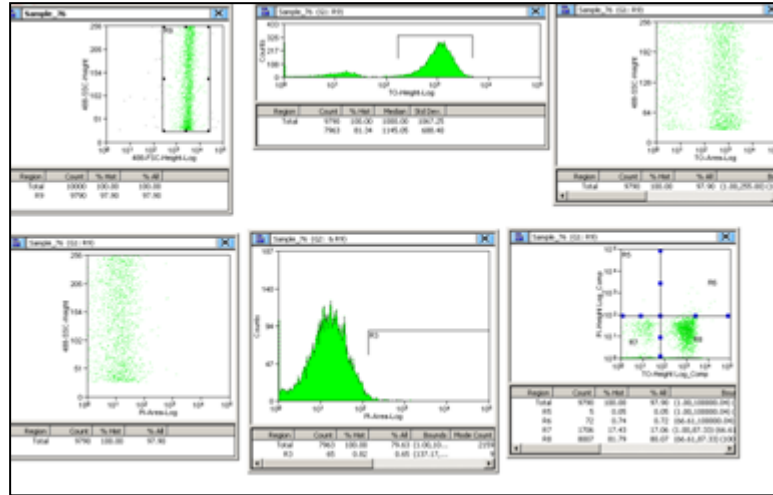
Akım sitometri analizinde Penisilin G ile yapılan duyarlılık çalışmalarında, referans yönteme göre dirençli tespit edilen iki izolatta (İzolat no 7 ve izolat no 10) yüksek oranda PI bağlanması görüldü (% 69,64-% 64,15) (Şekil 12). Ancak analizler tekrar edildiğinde, PI bağlanma oranının yüksek olmadığı tespit edildi (%12,07-%2,08).

Şekil 12: Penisilin dirençli *B. fragilis*, beklenmeyen yüksek PI bağlanması



Farklı uyumsuz bir sonuç, referans yönteme göre metronidazol duyarlı bulunuan bir izolatta (İzolot no 6) düşük oranda PI bağlanması olarak görüldü (% 0,82) (şekil 13). Metronidazol duyarlı bu bakteride düşük oranda PI boyanması beklenmediğinden test tekrar edildi ve PI bağlanması % 99,10 olarak tespit edildi.

şekil 13: Metronidazol duyarlı *B. fragilis*, beklenmeyen düşük PI bağlanması



İzolot no 6

TO: % 8,34--PI: % 0,82

Akım sitometri ile yapılan tüm duyarlılık çalışmaları iki kez tekrar edildi. Tekrar edilen analizlerde en düşük PI bağlanması %1,05, en yüksek PI bağlanması %99,10 olarak bulundu.

Agar dilüsyon yöntemine göre dirençli tespit edilen izolatlardaki PI boyanma oranları %1,05 ile %29,39 arasında bulundu. Antibiyotiksiz hücre sspansiyonlarındaki düşük PI boyanma oranları, bakterilerin akım sitometri analizleri sırasında oksijenden etkilenmediğini gösterdi (Tablo 18).

Tablo 18: Akım sitometri analizi ile *Bacteroides* türlerinde antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde kullanılan antibiyotik konsantrasyonları ve TO (%) ve PI (%) ile boyanma oranları:

izolat no	Antibiyotiksiz boyanma oranları (%)		Meropenem (4 µg/mL)		Kloramfenikol (8 µg/mL)		Metronidazol (4 µg/mL)		Amoksisilin-Klavulanik asit (4/2 µg/mL)		Klindamisin (4 µg/mL)		Penisilin G (0.25 µg/mL)	
	TO (%)	PI (%)	TO (%)	PI (%)	TO (%)	PI (%)	TO (%)	PI (%)	TO (%)	PI (%)	TO (%)	PI (%)	TO (%)	PI (%)
1	89,51	2,56	91,47	76,72	86,80	32,34	90,27	50,62	85,02	63,69	85,22	63,69	95,94	7,10
2	89,67	3,21	71,07	64,01	89,68	44,26	53,63	76,75	98,01	42,87	98,49	64,79	50,75	3,98
3	97,93	1,95	98,84	77,69	98,92	55,01	97,95	42,69	97,32	52,77	95,24	19,08	97,53	9,63
4	88,4	1,95	92,17	63,85	96,45	50,68	72,51	60,28	94,80	29,39	98,10	41,40	95,44	1,77
5	95,85	2,03	90,78	45,98	95,88	58,93	95,14	36,20	96,16	41,71	97,41	60,46	97,61	2,83
6	87,76	1,90	71,18	73,37	89,06	63,47	92,51	99,10	85,99	74,52	67,96	77,81	97,08	1,05
7	88,37	2,71	79,63	7,42	93,27	75,01	90,74	92,32	95,04	14,31	94,24	18,08	98,04	12,07
8	95,25	1,71	91,27	58,32	90,56	82,38	92,18	86,22	78,24	81,08	96,97	59,83	92,91	8,49
9	78,70	2,05	95,40	3,74	96,46	80,54	96,26	82,08	93,61	1,90	96,27	87,25	95,43	9,16
10	92,80	1,66	89,93	72,37	42,80	65,12	66,46	55,61	67,61	36,22	98,24	44,64	66,43	2,08

Akım sitometri ile yapılan analizlerde, antibiyotik etkisi altında kalarak hücre membran potansiyeli bozulan hücreler PI ile boyandı. Akım sitometri analizlerinden elde edilen PI boyanma oranları kullanılarak, çalışmadaki tüm antibiyotikler için ortak, meropenem, klindamisin ve amoksisilin klavulanik asit için ayrı ve antibiyotik grupları (bakterisidaller ve bakteriyostatikler) için ortak olacak şekilde farklı duyarlılık ve özgüllükte farklı ‘klinik sınır değer PI boyanma oranları (%)’ belirlendi (Tablo 19).

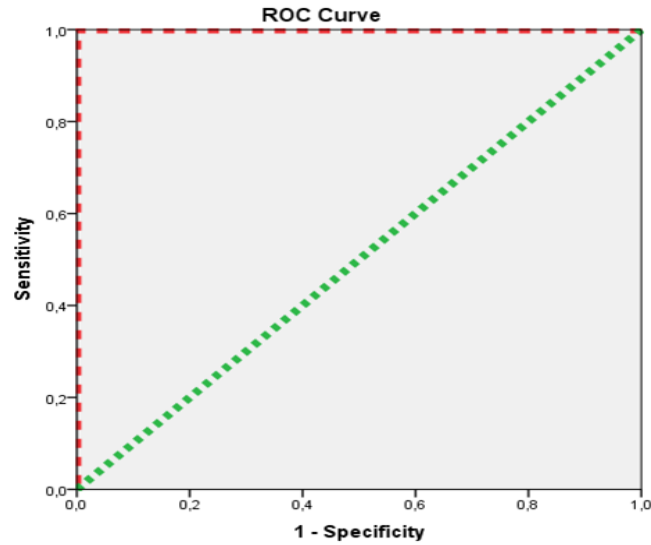
Tablo 19: ROC analizine göre farklı duyarlılık ve özgüllükte hesaplanan farklı 'klinik sınır değer PI boyanma oranları (%)'

Hesaplanan Klinik Sınır Değer (break point) (PI boyanma oranına göre)	Duyarlılık	1-Özgüllük
9,3950	1,000	,222
10,8500	1,000	,185
13,1900	1,000	,148
16,1950	1,000	,111
18,5800	1,000	,074
24,2350	1,000	,037
30,8650	1,000	0,000
33,2800	,977	0,000
35,2100	,953	0,000
38,8000	,930	0,000

ROC analizinde kesim noktasını belirlerken yüksek veya düşük bir değeri kabul etmek farklı sonuçlara neden olmaktadır. ROC analizinde yeni bir test için kesim noktasına karar verirken, test için belirlenmiş bir duyarlılık ve özgüllük değeri yok ise, testin duyarlılığı en az %95 olmalıdır. Ayrıca duyarlılık ve özgüllük değerlerinin toplamının en yüksek bulunduğu nokta en iyi kesim noktası olarak belirlenir (31,32).

Çalışmada yapılan tüm ROC analizlerinde, eğri altında kalan (AUC-Area Under Curve) alanın değeri 1,0 olarak bulundu (Şekil 14). Eğri altında hesaplanan bu AUC:1 değeri testin ayırt edici gücünün %95 güven aralığında mükemmel olduğunu göstermektedir (31,32).

Şekil 14: Agar dilüsyon sonuçlarına göre dirençli ve duyarlı bakterilerin PI boyanma oranlarına göre elde edilen ROC eğrisi



(Çalışmadaki tüm antimikrobiyaller için hesaplanmıştır.)

Area Under the Curve

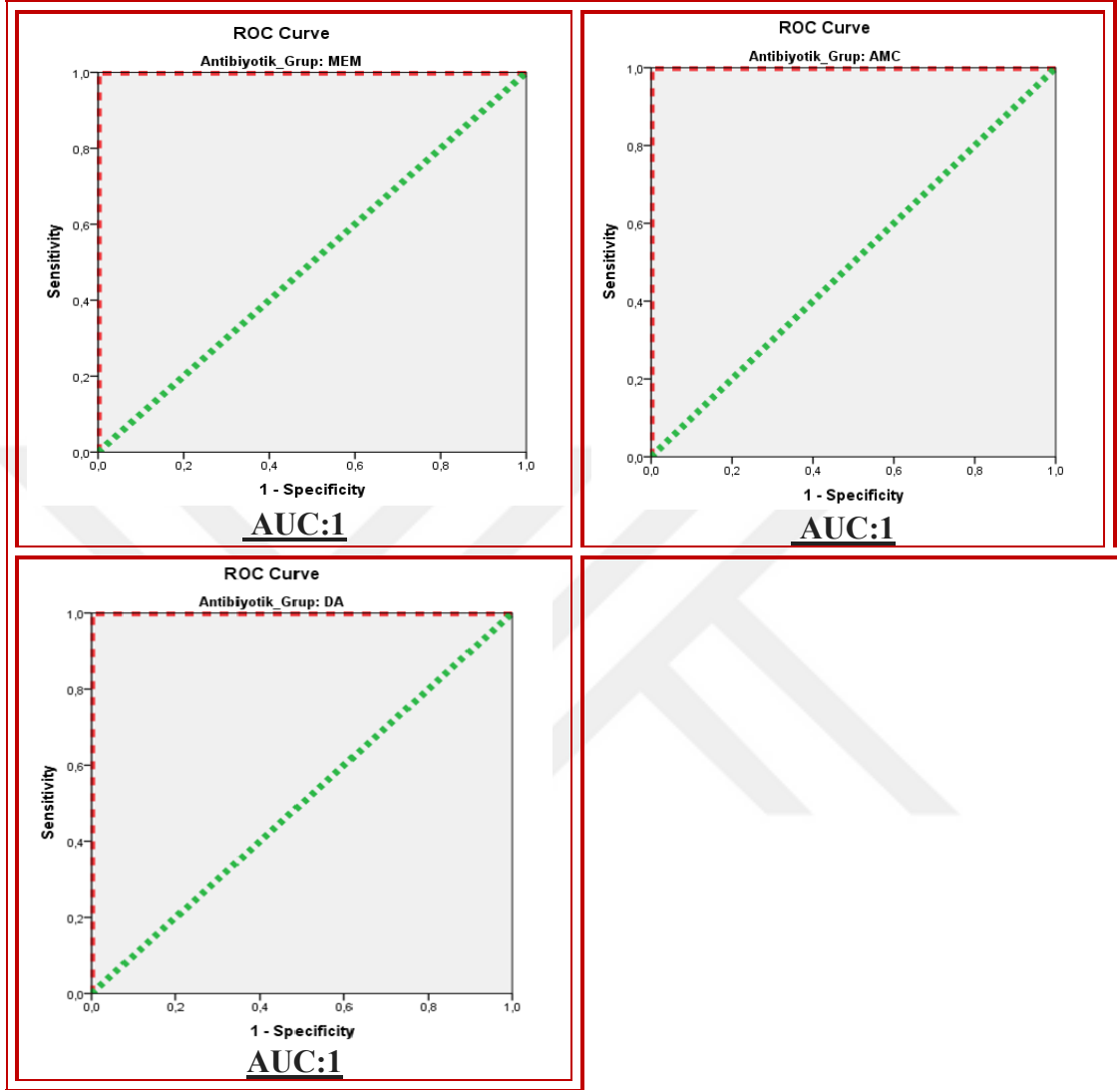
Test Result Variable(s): **PI**

Area	Std. Error	Asymptotic Sig.	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1,000	0,000	,000	1,000	1,000

Bacteroides türlerinde antimikrobiyal duyarlılığın tespitinde, çalışmada yer alan 6 antibiyotik için ortak 'Klinik Sınır Değer PI Boyanma Oranı (%)', %95 güven aralığında, %100 duyarlılık ve %100 özgüllükte %30,86 olarak bulundu. Agar dilüsyon sonucuna göre dirençli tespit edilen tüm bakterilerde PI boyanma oranı %30,86'nın altında kalırken, duyarlı tespit edilen tüm bakterilerde PI boyanması bu oranın üstünde kaldı.

Bu klinik sınır değer %95 güven aralığında, %100 duyarlılık ve %100 özgüllükte meropenem için %26,70, amoksisilin-klavulanik asit için %35,55, klindamisin için %30,24 bulundu (Şekil 15 ve Tablo 20).

Şekil 15: Çalışmadaki her bir antibiyotik (meropenem, amoksisilin-klavulanik asit ve klindamisin) için elde edilen ROC eğrisi (PI boyanma oranına göre)

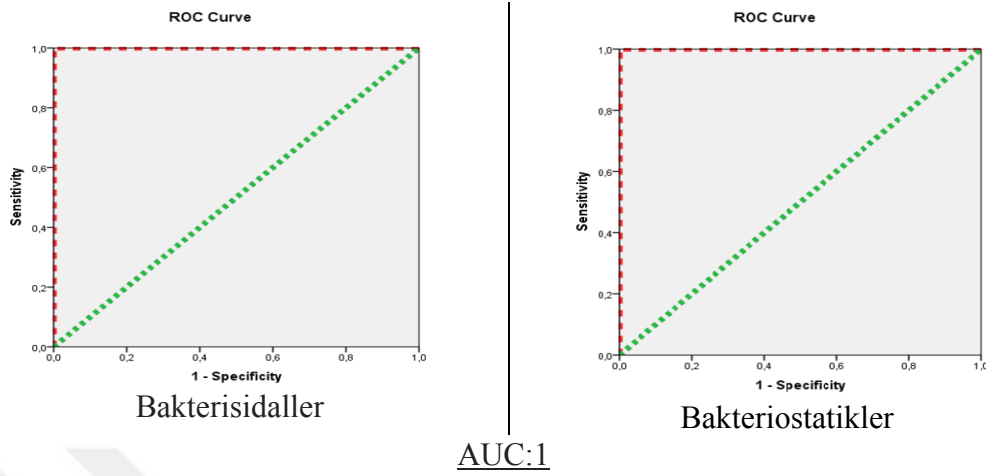


Tablo 20: ROC analizi ile meropenem, amoksisilin-klavulanik asit ve klindamisin için farklı duyarlılık ve özgüllükte hesaplanan ‘Klinik Sınır Değer PI Bağlanma Oranları (%)’

Antibiyotik Grubu	Hesaplanan klinik sınır değer PI bağlanma (%)	Duyarlılık	1 - Özgüllük
MEM	2,7400	1,000	1,000
	5,5800	1,000	,500
	26,7000	1,000	0,000
	52,1500	,875	0,000
	61,0850	,750	0,000
	63,9300	,625	0,000
AMC	,9000	1,000	1,000
	8,1050	1,000	,667
	21,8500	1,000	,333
	35,5500	1,000	0,000
	42,2900	,857	0,000
	43,7550	,714	0,000
DA	17,0800	1,000	1,000
	18,5800	1,000	,500
	30,2400	1,000	0,000
	43,0200	,875	0,000

Çalışmada kullanılan bakterisidal ve bakteriostatik antibiyotikler için ortak olarak hesaplanan AUC değeri 1 bulundu. Buna göre bakterisidal etki gösteren tüm antimikrobiyaller için ‘Klinik Sınır Değer PI Boyanma Oranları (%)’ %100 duyarlılık ve %100 özgüllükte %31.80, bakteriostatik etki gösteren tüm antimikrobiyaller için ise %25,71 olarak bulundu (Şekil 16 ve Tablo 21).

Şekil 16: Antibiyotik grupları (bakterisidaller ve bakteriostatikler) için elde edilen ROC eğrisi (PI boyanmasına göre):



Tablo 21: ROC analizi ile bakterisidaller ve bakteriostatikler için farklı duyarlılık ve özgüllükte hesaplanan 'Klinik Sınır Değer PI Boyanma Oranları (%)

Antibiyotik Grubu	Klinik Sınır Değer	Duyarlılık	1 - Özgüllük
Bakterisidaller	13,1900	1,000	,133
	21,8500	1,000	,067
	31,8050	1,000	0,000
	35,2100	,960	0,000
	38,9550	,920	0,000
Bakteriostatikler	18,5800	1,000	,500
	25,7100	1,000	0,000
	36,8700	,944	0,000

Çalışmada metronidazol ve kloramfenikol dirençli, penisilin duyarlı *Bacteroides* türleri olmadığından, bu antibiyotikler için ROC analizi ile klinik sınır değer PI boyanma oranları hesaplanamadı. Bakterilerin metronidazol ve penisilin için duyarlı/dirençli değerlendirmesi, bakterisidaller için hesaplanan %31,30 olan 'klinik sınır değer PI boyanma oranı'na göre yapıldı. Bakterilerin kloramfenikol için duyarlı/dirençli değerlendirmesi, bakteriostatikler için hesaplanan %25,71 olan 'klinik sınır değer PI boyanma oranı'na göre yapıldı. Agar dilüsyon sonucuna göre bakterisidal etki gösteren antibiyotiklere dirençli tespit edilen tüm bakterilerde PI boyanma oranı %31,80'nin altında kalırken, bakterisidallere duyarlı tespit edilen tüm bakterilerde PI boyanması bu oranın üstünde kaldı. Yine agar dilüsyon sonucuna

göre bakteriostatik etki gösteren antibiyotiklere dirençli tespit edilen tüm bakterilerde PI boyanma oranı %25,71'nin altında kalırken, bakteriostatiklere duyarlı tespit edilen tüm bakterilerde PI boyanması bu oranın üstünde kaldı.

TARTIŞMA

Anaerop bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının tespiti, günümüzde artan direnç sorunu ile birlikte giderek önem kazanmıştır. Özellikle *B. fragilis* grup izolatlarında beta-laktam antibiyotikler ve metronidazole giderek artan direnç bildirilmektedir (6,7,11,12,33,34). Ancak anaerop bakterilerin duyarlılık test yöntemleri zahmetli ve zaman alıcı yöntemler olduğundan rutin olarak uygulanmamaktadır. Yapılan araştırmalar anaerop bakterilerin duyarlılık testlerinin ABD'deki hastanelerin ancak %21'inde uygulandığını göstermiştir (34).

Disk diffzyon yöntemi anaerop bakteriler için tavsiye edilmeyen bir yöntem olmasına rağmen, özellikle *B. fragilis* ve *Clostridium difficile* gibi hızlı üreyen anaeroplara için hızlı, pratik ve ucuz bir yöntemdir (33,35). Bu bakteri türleri için disk diffzyon yöntemi standardizasyon çalışmaları devam etmektedir. Bununla ilgili British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) *B. fragilis* ve *Clostridium difficile* türleri için 2011 yılında zon çapı breakpoint'leri belirtmiştir (36). Yöntemin sadece belirli türler (*B. fragilis* ve *Clostridium difficile*) üzerinde test edilmesinden kaynaklanan veri azlığı, agar plağı üzerindeki pH değişiminin nazlı üreyen anaeroplara etkilemesi ve sonuçların MİK değerleri ile uyumsuz olmasından dolayı halen tavsiye edilmemektedir. (33,35,37).

Günümüzde hayatı tehdit eden bakteri enfeksiyonları ve artan antimikrobiyal direnç sorunu göz önüne alındığında, hızlı ve otomatize antimikrobiyal duyarlılık sistemlerin gerekliliği artmaktadır (38). Bu yöntemler arasında yer alan akım sitometri yöntemi, diğer duyarlılık test yöntemleri ile karşılaştırıldığında oldukça hızlı sonuç veren bir yöntemdir. Akım sitometri yöntemi kullanılarak yapılan antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları ile 2-3 saat gibi kısa bir sürede sonuç alınabileceği gösterilmiştir. Ancak kullanılan floresan boyarla ilgili yetersizlikler ve boyaların her bir bakteri türünü farklı boyama özelliğinin olması, hücrelerin ofloresan ışığa göstermesi, test edilen antibiyotiklerin farklı bakterisidal ve bakteriostatik etki göstermesi, validasyon için yeterli verinin olmaması yöntemin kısıtları arasında belirtilmiştir (38). Ayrıca hücre süspansiyonlarının hazırlanmasında izlenecek protokol, bakteri üreme fazı, kullanılan antibiyotiklerin ve hücre

süspansiyonlarının konsantrasyonlarının doğru bir şekilde hazırlanması göz önünde bulundurulması gereken hususlar arasındadır (21).

Hayden ve ark. akım sitometri yöntemini kullanarak, iki klinik izolat ve bir referans suş ile yaptıkları antibiyotik duyarlılık çalışmasında; Vitek2 ve MicroScan MIC ile elde ettikleri sonuçlarla akım sitometri sonuçları arasında yüksek kategorik uyum bulmuşlardır. Diğer belirtilen çalışmalardan farklı olarak, bu çalışmada floresan boya kullanılmadan, 'lazer mikrobiyal üreme monitör teknolojisi' ile (BacteriScan) ışık saçılım eğrileri değerlendirilmiştir. Bu teknoloji ile sıvı örneklerde OD (optik dansite) değeri, ileri laser ışık saçılmaları (FLLS) ile hesaplanabilmektedir. Çalışmada ışık saçılım eğrileri sonucu bulunan OD değerleri ile AUC değeri hesaplanmıştır ve bu AUC değerine göre antimikrobiyal duyarlılığa karar verilmiştir. Çalışmada BacteriScan sistemi ile ESBL üreten *E.coli* suşunda sefepim direncinin tespit edilmesi, sefepim orta duyarlı bulunan *P.aeruginosa* suşunda sefepim direncinin tespit edilmesi 'minör hata' olarak bildirilmiştir. Yine iki farklı *P.aeruginosa* suşunda siprofloksasin, sefepim ve gentamisin, bir *S. aureus* suşunda ise moksifloksasin için minör hata bildirilmiştir (39). *Candida* türlerinde PI boyası kullanılarak yapılan akım sitometri analizi sonucunda, *C. lusitaniae*'de referans yöntem broth mikrodilüsyondan farklı olarak amphotericin B'de yüksek MİK tespit edilmiştir. Bu durumun CLSI'nin antifungal duyarlılığın tespitinde kullanılan yöntemin kısıtlılığından ileri geldiği belirtilmiştir (26).

Akım sitometri yönteminde çeşitli floresan boyaların birlikte kullanılmasıyla, antimikrobiyaller gibi çeşitli toksik etkilerin bakteri hücreleri üzerindeki etkisi, dolayısıyla ölü/canlı hücre ayrımı kolaylıkla yapılabilmektedir (17-21,25-30,38,40). Özellikle hücrelerin membran potansiyellerindeki değişimlerden yola çıkılarak yapılan akım sitometri uygulamaları, bakterilerle yapılan antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarının temelini oluşturmuştur (40).

Tavenier ve ark., yaptıkları akım sitometri çalışmasında TO ve PI boylarını kullanarak, idrar örneklerinde canlı/ölü bakteri hücresi ayrımını yapmışlardır. Çalışmalarında idrar örneklerindeki canlı bakterilerin ayrımı için yaptıkları ROC analizinde buldukları AUC değeri %95 güven aralığında 0,93'tür. Elde ettikleri bu AUC değerine göre, akım sitometri analizinde TO ve PI boylarının birlikte

kullanılmasıyla canlı/ölü ayırımının net bir şekilde yapılabildiğini vurgulamışlardır (29).

Doherty ve ark., çalışmalarında hücredeki nükleik asitleri boyayan hücre geçirgen TO ve hücre geçirgen olmayan PI boya larını birlikte kullanarak hücre canlılığına karar verebilmişlerdir. Boi ve ark. ise SYBR Green I ve PI boya larını birlikte kullanarak antibiyotik etkisi altındaki *Escherichia coli* suşlarının canlılıklarını değerlendirmişlerdir (41). Diaper ve ark., özellikle ökaryotik hücreler için kullanılan vital boyalardan rhodamin 123 (Rh123), 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide [DiOC₆(3)] ve fluorescein diacetate (FDA)'ı akım sitometri uygulamalarında kullanarak, bu boya ların farklı bakteri türleri üzerindeki etkinliğini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında; Rh123 floresan boya sı kullanılarak *E.coli* ve *S.aureus* türlerinde canlı/ölü hücre ayırımını çok iyi yapılabildiğini, ancak bazı *Aeromonas*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* türlerinde Rh123 floresans boyasının kullanılamayacağını belirtmişlerdir. Çalışmalarında gram pozitif ve gram negatif bakterilerde canlı/ölü hücre ayırımının, boyanın ancak farklı konsantrasyonlarının kullanımı ile mümkün olduğunu vurgulamışlardır (30).

Claude Saint-Ruf ve ark., antibiyotik etkisi altında kalan hücrelerin hücre membranlarındaki makromoleküllerin artan karbonilasyonunu ve bu molekülleri hedef alan AFH, TO-PRO®-3 and DiBAC₄(₃) floresan boya ları kullanarak, akım sitometri yöntemi ile *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antimikrobiyal aktiviteyi tespit etmeye çalışmışlardır. Çalışmada; 5 saat süresince antibiyotik etkisi altında kalan hücrelerde, kullanılan floresan boya ların ortalama floresan miktarını değerlendirmişlerdir. AFH ve DiBAC₄(₃) ile boyanan ölü hücrelerdeki floresan ışımının zamanla arttığını belirtmişlerdir. Ancak TO-PRO®-3 için aynı sonuç bulunmamıştır. İlk 2 saatten sonra bu boyanın floresan ışımında azalma tespit etmişlerdir (28).

Suller ve ark., akım sitometri yönteminde DiBAC₄ floresan boyasını kullanarak, 2 saat antibiyotik etkisi altında kalarak hücre membran potansiyeli bozulan metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında, ölü hücrelerdeki floresan saçılımını değerlendirerek antimikrobiyal duyarlılığı tespit etmişlerdir. Çalışmalarında, DiBAC₄ gibi oxonol grubu boya ların sadece membran bütünlüğü bozulmuş hücreleri boyadığı için antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarının boyadan

etkilenmeyeceğini, ancak rhodamin 123 gibi katyonik boya ların hücrelere ilave bir zarar verebileceğinden dolayı, antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında beklenmedik sonuçlara neden olabileceğini vurgulamışlardır (25). Bu sonuç bize akım sitometri uygulamalarında kullanılan floresan boya larının seçimindeki önemi göstermiştir.

Çalışmamızda hücre geçirgen TO ve hücre geçirgen olmayan PI boya ları kullanarak *Bacteroides* türleri için antimikrobiyal duyarlılık tespit edilmeye çalışıldı.

Bacteroides türleri, diğer fakültatif anaerop bakterilerle birlikte klinik örneklerden en sık izole edilen anaerop bakteri türleridir (42).

Keukeleire ve ark. Belçika’da 2004-20013 yıllarını kapsayan sürveyans çalışmasında anaerop bakterilerin bakteriyemi olgularının %5’inden sorumlu olduğunu, *Bacteroides* ve *Parabacteriodes* türlerinin bu anaeroplara nın %47,1’ini oluşturduğunu bildirmişlerdir (43). Tan ve ark., yine bakteriyemi ile ilgili çalışmalarında, *B. fragilis* grup üyelerinin bakteriyemiye neden olan tüm anaeroplara nın %41’ini oluşturduğunu ve bazı anaerop bakteri suşlarının imipeneme ve metronidazole dirençli olduğunu bildirmiştir (44). Özellikle kan gibi steril vücut sıvılarından izole edilen ve *Bacteroides fragilis* gibi yüksek virülansa sahip anaerop bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık testlerinin hızlı ve güvenilir olarak yapılabilmesi, günümüzde daha da önem kazanmaktadır.

Akım sitometri yöntemini kullanarak, pozitif kan kültürlerinden subkültüre ihtiyaç duymaksızın 4 saat gibi kısa bir sürede antimikrobiyal duyarlılık sonucu alınabilmektedir. Yapılan çalışmalar, pozitif kan kültürlerinde Vitek 2 kullanılarak yapılan antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarının akım sitometri sonuçları ile % 85 uyumlu olduğunu göstermiştir (45).

Anaerop bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarını tespit etmek için geliştirilen yeni ticari sistemlerden ‘Sensititre’ yöntemi dikkat çekmektedir. Broth mikrodilüsyon yönteminin yarı-otomatize hale getirildiği, uygulanması kolay bir yöntemdir. Ancak Hughes ve ark., ‘Sensititre’ yöntemi ile E test yöntemini karşılaştırarak yaptıkları çalışmada, ‘Sensititre’ yönteminde kullanılan mikrodilüsyon plaklarında kontrol kuyucuğu dahil bazı kuyucuklarda *Prevotella* ve *Porphyromonas* türlerinde üremenin olmadığını, mikrodilüsyon sonuçlarının 48 saat sonunda rapor edildiğini bildirmişlerdir (34). Cherkaoui ve ark., ‘Sensititre’, ATB ANA ve E test yöntemini karşılaştırarak yaptıkları çalışmada ise, özellikle piperasilin, piperasilin-

tazobaktam ve penisilin sonuçlarında ciddi uyumsuzluk olduğunu ve bu uyumsuzluğun bakteri popülasyonundaki hetero dirençten kaynaklandığını bildirmişlerdir (46). MBT-ASTRA (MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay) ise mikroorganizmalarda antimikrobiyal duyarlılık yöntemlerine aday olan, MALDI-TOF MS temelli geliştirilen bir uygulamadır (47,48). *B. fragilis* ve belirli antibiyotikler ile yapılan antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında MBT-ASTRA'nın kısa zamanda, uyumlu sonuç verdiği bildirilmiştir. Ancak kısıtlı sayıda antibiyotikle çalışılması ve çalışmanın antimikrobiyal duyarlılığı klinik sınır değere yakın olan suşları kapsamaması yöntemin kısıtlılıkları arasında raporlanmıştır (49).

Akım sitometri yöntemi kullanılarak *Bacteroides* türleri ile yapılan çalışmalar günümüze dek devam etmiştir. LA Van der Waaij ve ark., akım sitometri yönteminde PI ve anti-human-IgA işaretlenmiş FITC boya larını kullanarak insan dışkı sında kültüre edilemeyen anaerobik bakterileri tespit etmişlerdir (50). Lulton ve ark., ise akım sitometri yönteminde floresan işaretli monoklonal antik orları kullanarak *Bacteroides fragilis* suşlarında polisakkarit tabakasının ekspresyonundaki farklılıkları gözlemleyerek, polisakkarit tabakasındaki bu farklılıkların, bakterilerin virülansı ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (51).

Çalışmamızda *Bacteroides* türlerinde antimikrobiyal aktivitenin akım sitometri yöntemi ile hızlı tespit edilmesi amaçlandı. *Bacteroides* türlerinde antimikrobiyal duyarlılığa karar vermede 'Klinik Sınır Değer PI Boyanma Oranı (%)' kullanıldı. 'Klinik sınır değer PI boyanma oranı' hesaplanmasında ROC analizi yapıldı.

PI boyası temel alınarak yapılan ROC analizi sonucunda çalışılan tüm antimikrobiyaller için ortak hesaplanan 'Klinik break point PI boyanma oranı' değeri %95 güven aralığında, %100 duyarlılık ve %100 özgüllükte %30,86 olarak bulundu. Referans yönteme göre dirençli tespit edilen tüm izolatlarda PI boyanma oranı %30,86'nın altında kalırken, duyarlı tüm izolatlarda bu değerin üstünde tespit edildi.

Bu klinik sınır değer %95 güven aralığında, %100 duyarlılık ve %100 özgüllükte meropenem için %26,70, amoksisilin-klavulanik asit için %35,55, klindamisin için %30,24, çalışmada kullanılan bakterisidal etki gösteren tüm antimikrobiyaller için %31,80, bakteriyostatik etki gösteren tüm antimikrobiyaller için ise %25,71 bulundu.

Çalışmada her bir bakteri için yapılan antibiyotiksiz akım sitometri okumalarında PI boyanma oranlarının oldukça düşük olduğu görüldü. Bu sonuç bize, bakterilerin antibiyotik duyarlılık çalışmaları esnasında oksijenden etkilenmediğini gösterdi. *Bacteroides fragilis* grup üyelerinde beklenen penisilin direnci agar dilüsyon sonuçlarımızla paralel olarak, düşük oranda PI boyanması ile tespit edildi.

Agar dilüsyon sonuçlarına göre iki *B. fragilis* suşunda yüksek MİK'de meropenem direnci, iki izolatta klindamisin direnci, üç izolatta ise amoksisilin-klavulanik asit direnci tespit edildi. Referans yönteme göre dirençli tespit edilen bu izolatlardaki PI boyanma oranları, hesaplanan klinik sınır değerlerinin altında tespit edildi.

Çalışmada bir *Bacteroides fragilis* izolatının AMC sonucunda, referans yöntem ile E test sonucu arasında 2 dilüsyonluk fark bulundu. Test tekrar edildi ve bu bakteri agar dilüsyon sonucuna göre AMC dirençli kabul edildi. Referans yönteme göre bu bakteri AMC'ye dirençli bulunurken, E test sonucuna göre duyarlı bulunması, E-test yöntemi için 'çok büyük hata' olarak değerlendirildi. Ancak bu izolatta, yapılan ROC analizine göre %29,39 oranındaki PI boyanması, AMC için bulunan %35,55 ve tüm bakterisidaller için ortak olarak bulunan %31,80 olan kesim değerinin değerlerinin altında kaldı.

Bacteroides türlerinde çeşitli antibiyotiklere karşı antimikrobiyal duyarlılığın tespiti için yaptığımız akım sitometri çalışması ve referans yöntem olan agar dilüsyon metodu için 'temel kategori (kalitatif) karşılaştırması' yaptığımızda; akım sitometri yöntemi referans yöntem ile 'uyumlu' bulunmuştur. Agar dilüsyon sonuçlarımıza göre 'dirençli' olarak tespit ettiğimiz tüm bakterilerdeki PI bağlanma oranları, ROC analizlerine göre belirlenen kesim değerlerinin altında kalarak 'dirençli' olarak bulunmuştur. Aynı şekilde; agar dilüsyon sonuçlarımıza göre 'duyarlı' olarak tespit ettiğimiz tüm bakterilerdeki PI bağlanma oranları, ROC analizlerine göre belirlenen kesim değerlerinin üstünde kalarak 'duyarlı' olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre; çalışılan yeni metoda göre hata tipinin belirlenmesinde, çalışmamızda 'çok büyük hata' ve 'büyük hata'ya rastlanmadı. Akım sitometri yöntemi ve agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçlarda kategori hatası saptanmadığından, çalıştığımız yöntemin kategori uyum yüzdesi %100 olarak değerlendirilmiştir. Ancak laboratuvar test yöntemlerinde, klinik sonuçları

etkileyeceğinden dolayı hataların bir bütün olarak değerlendirilmesi gerekmektedir (13). Klinik izolatlarımızda, çalışılan herhangi bir antibiyotiğe karşı ‘orta duyarlı’ ve ‘klinik sınır değere eşit’ duyarlılık sonucu bulunmadığından ve klinik izolatların MİK değerlerinin klinik sınır değerlerden en az iki dilüsyon düşük olması nedeniyle, ‘minör hata’ ve olası ‘çok büyük hata’ çıkmamış olabilir. Çalışmaya dahil izolatlar içinde test edilen antibiyotikler için klinik sınır değerlere sahip izolatın yokluğu bu sonuca yol açmış olabilir.

Özellikle hızlı test sistemlerinde, sistemin klinik önemi olan dirençli izolatları saptayabilmesi oldukça önemlidir (13). Çalışmada, yüksek düzey meropenem direnci (MİK>32 µg/mL) saptanan iki *Bacteroides fragilis* türü, akım sitometri yöntemi ile dirençli tespit edilmiştir. Aynı şekilde *B. fragilis* türlerinde beklenen penisilin direnci, yine akım sitometri analizi ile tespit edilebilmiştir.

Bakterilerle yapılan duyarlılık test yöntemlerinde, çoğunlukla MİK değeri belirlenir. Ancak pek çok antimikrobiyal tedavinin başarısı, kullanılan ilacın bakterisidal dozuna ulaşıp ulaşılmamasına bağlıdır (6,52). Genelde bakterisidal antibiyotikler için MİK ve MBK değerleri birbirine eşit veya yakın değerlerdir. Buna karşılık bakteriostatik ilaçlarda MBK değeri MİK değerinin çok fazla üzerindedir (53).

Çalışmada meropenem ve klindamisin’in seri dilüsyonları ile yapılan analizlerde, antimikrobiallerin artan dilüsyon oranlarında PI boyanma oranının da arttığı görüldü. *B. fragilis* ATCC 25285’te meropenem’in MİK değeri <0,125 µg/mL olarak bulundu. Bu dilüsyonda bakterinin PI boyanma oranı %7,33 iken, meropenem için klinik alt sınır değer olan 2 µg/mL’de bu boyanma oranı %64,50 olarak bulundu. Benzer şekilde klindamisin’in MİK değeri ≤0,25 µg/mL bulunmasına rağmen PI boyanma oranının, dilüsyon 4 µg/ml’den itibaren arttığı görüldü.

Meropenem için 2,0 µg/mL, klindamisin için 4,0 µg/mL’lik dilüsyon değerleri EUCAST için alt klinik sınır değerler olup, bu dilüsyonun altındaki düşük PI boyanma oranları, bu dilüsyonların altındaki antibiyotik konsantrasyonlarında hücre membran potansiyelinin bozulmadığını, diğer bir ifadeyle bakteri hücrelerinin ölmediğini gösterilmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlarla, akım sitometri analizi ile *Bacteroides* türlerinde antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde, MBK değerleri ile daha uyumlu sonuçlar verilebileceği düşünölmektedir.

SONUÇLAR

Akım sitometri analizinde hücre geçirgen ve hücre geçirgen olmayan floresan boyaların birlikte kullanılmasıyla canlı/ölü hücre ayrımı kolaylıkla yapılabilmektedir. Bu yöntemle *Bacteroides* türlerinde antimikrobiyal duyarlılığın 1 saat gibi kısa bir sürede, MİK değerleri ile uyumlu olarak tespit edilebileceği düşünülmektedir.

Çalışmadaki uyumsuz PI bağlanmalarının kullanılan ekipmanın kompanzasyon ayarlarının standardize edilememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılacak her akım sitometri çalışması için, ekipman ayarlarının optimizasyonu gerekmektedir. Yöntem için ekipman ve deneyimli personel gereksinimi yöntemin kısıtları arasında yer almaktadır.

Akım sitometri yöntemi anaerob bakterilerin antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan diğer tüm konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha hızlı ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Ancak yöntemin yeterli sayıda izolat ve antibiyotik grubu ile yapılan çalışmalarla geliştirilmeye ihtiyacı vardır.

Çalışmamızda, klinik sınır değere eşit ve orta duyarlı *Bacterioides* türlerinin olmaması ve sınırlı sayıda bakteri ile çalışılması bir handikap oluşturmuştur.

Akım sitometri yönteminin sadece antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında değil, mikroorganizmalarla ilgili araştırılmak istenen birçok verinin analizi için umut verici bir yöntem olduğuna inanılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Aneorop Bakteri İnfeksiyonları, Ed. S. Ulusoy, H. Leblebicioğlu, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2005
2. Gürlür N, Pasteur, Anaerobik Yaşam ve Fermentasyon, Ankem, 25 (Ek-2), s. 1-4. 2011
3. Gürlür N, Anaerob İnfeksiyonlara Genel Bakış ve Antimikrobiyallere Direnç Durumu, Ankem, 15 (No. 3), s. 593-599, 2001
4. Aydın M. Anaerop bakteriler ve anaerobizm. Ed. C. M. Aydın. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel Ve Özel Mikrobiyoloji, Güneş Yayınevi, Konu 62. s: 569-576, 2004
5. Padmaja Ananth Shenoy, Shashidhar Vishwanath, Ashwini Gawda, Seema Shetty, Renuka Anegundi, Muralidhar Varma, Chiranjay Mukhopadhyay and Kiran Chawla, 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), p:44-48, Jul 2017
6. Tunçkanat F., Anaerop Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılık Testleri, Ankem Derg. 13 (No.3): 325-331, 1999
7. Hebe M. Bianchini, Methods for Susceptibility Testing in Anaerobes: When and How they Should be Used, Anaerobe 5, 417-420, 1999
8. Gürlür N., Anaerop Bakterilerin Duyarlılık Deneyleri, Ankem Derg. 10 (No.2): 229-236, 1996
9. Wexler H.M., Anaerobic susceptibility testing: where are we and where do we go from here? Zentralbl Bakteriöl., 287(1-2):1-5, 1998
10. Nagy E., Boyanova L., Justesen U.S., On Behalf of ESCMID Study Group of Anaerobic Infections, How To Isolate, Identify And Determine Antimicrobial Susceptibility Of Anaerobic Bacteria In Routine Laboratories? Clinical Microbiology and Infection, Volume 24, Issue 11, p:1139-1148, November 2018
11. Audrey N. S., Antimicrobial Resistance And Susceptibility Testing Of Anaerobic Bacteria, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 59, Issue 5, p: 698–705, 2014
12. Brook I., Wexler H. M., Goldstein E. J. C., Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum And Susceptibility Testing, CMR, Volume 26, n:3, p: 526-546, July 2013

13. Lynne S. Garcia, Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı, 3. Baskı, Ed. Başustaoğlu A., Yıldırım Ş.T., Atlas Kitapçılık
14. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Sixth Edition, CLSI M11-A6, Vol. 24, No. 2
15. Ozgur Kuru, Mustafa Ozyurt, Determination of antimicrobial susceptibilities of clinically isolated anaerobic bacteria by E-test, ATB-ANA and agar dilution, Anaerobe, Volume 14, Issue 3, Pages 161-165, 2008
16. Duyan S., Akım Sitometrisi Yöntemi İle Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Tespitinin Diğer Yöntemlerle Kıyaslanması, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2014
17. Michael K. Winson and Hazel M. Davey, Flow Cytometric Analysis of Microorganism, METHODS, Volume 21, Issue 3, p:231–240, July 2000
18. Taneli F., "Flow" Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı, Türk Klinik Biyokimya Derg, 5(2): 75-82, 2007
19. Ay C., Cantürk Z., Flow Sitometrinin Mikrobiyoloji Alanında Kullanımı, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, Cilt: 31, Sayı: 3, 144-151, Kasım 2015
20. Karaboz İ., Kayar E., Akar S., Flow Sitometri ve Kullanım Alanları, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi) Cilt: 06, Sayı: 2, s: 01-18, 2008
21. Alberto A'lvarez-Barrientos, Javier Arroyo, Rafael Canto' n, Ce'sar Nombela and Miguel Sa'nchez-Pe'rez, Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology, Clinical Microbiology Reviews, Volume:13, No:2, p: 167–195, Apr. 2000
22. Kuru Ö., Çeşitli İdentifikasyon Ve Duyarlılık Test Yöntemlerinin Anaerobik Bakterilerde Uygulanabilirlikleri, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2000
23. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, Summanen P., Baron E.J., Citron D.M., Strong A.C., Wexler M.H., Finegold M.S., Fifth Edition, 1993
24. CLSI M100-S25, Performance Standart for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty fifth Informational Supplement, 2015
25. Suller M. T. E., Starkb J. M. and Lloyd D., A Flow Cytometric Study Of Antibiotic-İnduced Damage And Evaluation As A Rapid Antibiotic Susceptibility

- Test For Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume: 40, Issue 1, p:77–83, 1997.
26. Ramani R., Chaturvedi V., Flow Cytometry Antifungal Susceptibility Testing Of Pathogenic Yeasts Other Than *Candida albicans* And Comparison With The Necls Broth Microdilution Test, Antimicrobial Agents And Chemotherapy, Volume: 44, No: 10, p:2752–2758, Oct. 2000.
27. Kilic A, Dogan E, Kaya S, Oren S, Tok D, Ardic N, Baysallar M, Rapid Identification of *Klebsiella pneumoniae* by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Detection of Meropenem Resistance by Flow Cytometric Assay, Journal of clinical Laboratory Analysis 00: p:1-7, 2016.
28. Saint-Ruf C, Crussard S, Franceschi C, Orenca S, Ouattara J, Ramjeet M, Surre J, Matic I, Antibiotic Susceptibility Testing of the Gram-Negative Bacteria Based on Flow Cytometry, Front Microbiol., Volume: 7, Article 1121, p: 1-13, July 2016
29. Tavenier A. H., de Boer F. J., Moshaver B., van der Leur S.J.C.M., Stegeman Coen A., Groeneveld P.H.P., Flow Cytometric Analysis Of Viable Bacteria In Urine Samples Of Febrile Patients At The Emergency Department, Clinical Cytometer, Volume 94, Issue 5, p: 689-695, 2018.
30. Diaper JP, Tither K, Edwards C, Rapid Assessment Of Bacterial Viability By Flow Cytometry, Applied Microbiology and Biotechnology, Volume:38, Issue:2, p: 268–272, November 1992.
31. Kılıç S., Klinik Karar Vermede ROC Analizi, Journal of Mood Disorders Volume: 3, Number: 3, p:135-140, 2013
32. Jerome Fan, Suneel Upadhye, Andrew Worster, Understanding receiver operating characteristic (ROC) curves, Canadian Journal of Emergency Medicine, Volume: 8, Issue: 1, p: 19-20, 2006
33. Elisabeth Nagy, Ulrik Stenz Justesen, Zsuzsa Eitel, Edit Urban, on behalf of ESCMID Study Group on Anaerobic Infection, Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates, Anaerobe, p:1-7, 2014

34. Hughes C., Ashhurst-Smith C., Ferguson J. K., Gram Negative Anaerobe Susceptibility Testing In Clinical Isolates Using Sensititre And E Test Methods, Pathology, Volume: 50, Issue: 4, p: 1–5, June 2018
35. Samson Sai-YinWong, Patrick Chiu-YatWoo,Wei-KwangLuk,Kwok-YungYuen, Susceptibility testing of *Clostridium difficile* against metronidazole and vancomycin by disk diffusion and Etest, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Volume 34, Issue 1, Pages 1-6, 1999
36. J. M. Andrews and R. A. Howe for the BSAC Working Party on Susceptibility Testing, BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 10), J Antimicrob Chemother, Volume: 66, Issue: 12, p:2726–2757, December 2011
37. Edmir Geraldo Fraga, Antonio Carlos Nicodemo, Jorge Luiz Mello Sampaio, Antimicrobial susceptibility of Brazilian *Clostridium difficile* strains determined by agar dilution and disk diffusion, Braz J Infect Dis Volume: 20, No: 5, p: 476–481, Oct. 2016
38. Karan Syal, Manni Mo, Hui Yu, Rafael Iriya1, Wenwen Jing, Sui Guodong, Shaopeng Wang, Thomas E. Grys, Shelley E. Haydel and Nongjian Tao, Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests, Theranostics, Vol. 7, Issue 7, 2017
39. Hayden R.T., Clinton L. K., Hewitt C., Koyamatsu T., Yilun S., Jamison G., Perkins R., Tang L., Pounds S., Bankowski M. J., Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing Using Forward Laser Light Scatter Technology, J. Clin. Microbiol., Volume:54, No: 11, November 2016
40. Steen H. B , Flow Cytometry Of Bacteria: Glimpses From The Past With A View To The Future, Journal Of Microbiological Methods, Volume: 42, Issue:1,p: 65-7442, September 2000
41. Wu L., Wang S. , Song Y. , Wang X., Yan X. , Applications And Challenges For Single-Bacteria Analysis By Flow Cytometry, Science China Chemistry, Volume 59, Issue 1, p: 30–39, 2016.
42. Padmaja Ananth Shenoy, Shashidhar Vishwanath, Ashwini Gawda, Seema Shetty, Renuka Anegundi,Muralidhar Varma, Chiranjay Mukhopadhyay and Kiran Chawla, Anaerobic Bacteria in Clinical Specimens – Frequent, But a Neglected Lot:

A Five Year Experience at a Tertiary Care Hospital, J Clin Diagn Res., Volume:11(7), July 2017

43. Keukeleire S. D., Wybo I., Naessens A., Echahidi F., Beken M. V., Vandoorslaer K., Vermeulen S., Pierard D., Anaerobic Bacteraemia: A 10-Year Retrospective Epidemiological Survey, Anaerobe, Volume: 39, p:954-59, June 2016

44. Tan T. Y., Yong Ng L. S., Kwang L.L., Rao S., Eng L. C., Clinical Characteristics And Antimicrobial Susceptibilities Of Anaerobic Bacteremia In An Acute Care Hospital, Anaerobe, Volume: 43, p:69-74, February 2017

45. Nuding S. and Zabel L. T., Detection, Identification and Susceptibility Testing of Bacteria by Flow Cytometry, Journal of Bacteriology and Parasitology, s:5, 2013

46. Cherkaoui A., Fischer A., Azam N., Riat A., Schrenzel J., A Comparison Of Sensititre™ Anaerobe MIC Plate With ATB ANA® test For The Routine Susceptibility Testing Of Common Anaerobe Pathogens, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Volume 37, Issue: 12, p: 1–6, December 2018

47. Sparbier K., Schubert S., Kostrzewa M., MBT-ASTRA, A Suitable Tool For Fast Antibiotic Susceptibility Testing?, Methods, Volume 104, Pages 48-54, July 2016.

48. Burckhardt I. , Zimmermann S., Susceptibility Testing of Bacteria Using Maldi-Tof Mass Spectrometry, Front Microbiol. Volume:9, Article: 1744, August 2018

49. Justesen U. S., Acar Z., Sydenham T., V., Asa Johansson, Antimicrobial Susceptibility Testing of *Bacteroides fragilis* Using The MALDI Biotyper Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay (MBT-ASTRA), Anaerobe, Volume: 54, p: 236-239, December 2018

50. L. A. van der Waaij MD, Mesander G. , Limburg P. C. , D. van der Waaij, Direct Flow Cytometry Of Anaerobic Bacteria In Human Feces, Cytometry 16: p: 270-279, 1994.

51. Lulton D. A., Patrick S., Crockard D., Stewart L. D., Larkin M. J., McNeill E. D. and T. A., Flow Cytometric Analysis Of Within-Strain Variation In Polysaccharide Expression by *Bacteroides fragilis* by Use Of Murine Monoclonal Antibodies, J. Med. Microbiol., Vol. 35, p: 229-237,1991

52. Sylvia Natalie Kłodzińska, Petra Alexandra Priemel, Thomas Rades, Hanne Mørck Nielsen, Combining diagnostic methods for antimicrobial susceptibility

testing – A comparative approach, Journal of Microbiological Methods, Volume: 144, p: 177–185, January 2018

53. Sümerkan B., Gökahmetoğlu S., MIC, MBC Testleri, Rutindeki Önemi ve Uygulamaları, Flora 1998;3(2):91-95



EKLER

EK-1: ETİK KURUL KARARI



TC Sağlık Bakanlığı

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara İli Kamu Hastaneleri Birliği 2 Nolu Genel Sekreterliği
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabipliği
Klinik Araştırma Etik Kurulu

Sayı : 2012-KAEK-15/1385
Konu: Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Etik Kurul Kararı

12.04.2017

KEÇİÖREN EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMA ETİK KURULU

“Anaerob Bakterilerde Antimikrobiyal Direncin Akım Sitometrisi Yöntemi İle Tespiti” adlı klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının başvuru sahibi tarafından sağlık bakanlığına arzına gerek olmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

Op. Dr. Ömer Faruk TANER
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Pınarbaşı Mahallesi Sanatoryum Cad.
Ardahan Sokak No:25 Keçiören / ANKARA
Web: www.akeah.gov.tr

EK 2. TEZ KONUSU ONAY FORMU



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANKARA

GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 25.05.2017
Toplantı Sayısı : 11 (09)
Karar Sayısı : 0000194

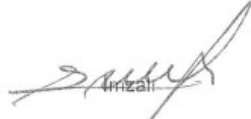
Gülhane Tıp Fakültesi Dekanlığı Tıbbi Mikrobiyoloji AD.Bşk.lığı doktora programı öğrencisi Sinem KAYA'nın "Anaerob Bakterilerde Antimikrobiyal Duyarlılığın Akım Sitometrisi Yöntemi ile Tespiti." tez konusu önerisi.

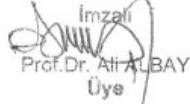
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 25.05.2017 tarih 11 (09) sayılı oturumunda oy birliğiyle kabul edildi.



Aslan PEHLIVANLI
Enstitü Sekreteri

YÖNETİM KURULU

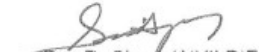
İmzalı
Prof.Dr.Ömer AZAL
Enstitü Müdürü


İmzalı
Prof.Dr. Yalçın ÖZKAN
Üye


İmzalı
Prof.Dr. Ali ALBAY
Üye


İmzalı
Prof.Dr. N.İşıl SAYGUN
Üye


İmzalı
Doç.Dr. Mehmet ÇETİN
Üye


İmzalı
Doç.Dr. Simge AYYILDIZ
Üye

EK 3: TEZ BAŞLIĞI DEĞİŞTİRME FORMU



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANKARA

GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 01.11.2018
Toplantı Sayısı : 47(23)
Karar Sayısı : 0000710

Tıbbi Mikrobiyoloji doktora programı öğrencisi Sinem KAYA'nın tez izleme komitesinin önerisi üzerine tez başlığı değişikliği önerisi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01.11.2018 tarih 47 (23) sayılı oturumunda oy birliğiyle kabul edildi.

Öğrencinin:

Adı Soyadı	Statüsü	Tez Başlığı
Sinem KAYA	Doktora	Yeni Tez Başlığı: Bacteroides Türlerinde Antimikrobiyal Duyarlılığın Akım Sitometri Yöntemi İle Hızlı Tespiti. Eski Tez Başlığı: Anaerob Bakterilerde Antimikrobiyal Duyarlılığın Akım Sitometri Yöntemi İle Tespiti.

Ahmet DOĞAN
Enstitü Sekreteri

YÖNETİM KURULU

Prof.Dr. Ömer AZAL
Enstitü Müdürü

Prof.Dr. Yalçın ÖZKAN
Üye

Prof.Dr. Ali ALBAY
Üye

Doç.Dr. Mehmet ÇETİN
Üye

Doç.Dr. Simel AYYILDIZ
Üye

Doç.Dr. Ayşe KILIÇ
Üye

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Sinem KAYA

Doğum yeri ve tarihi: Giresun-1980

Uyruğu: T.C

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu:

İletişim adresi ve telefonu: 0 (506) 479 37 64

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

2010-2012: Yüksek Lisans-Gülhane Askeri Tıp Akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

1998-2002: Lisans- Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

IV- Mesleki Deneyimi

2007-2009: GATA Haydarpaşa Askeri Hastanesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, İstanbul

2009-2016: Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara

2016-----: Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları: (Ulusal ya da uluslararası makale, bildiri, poster, kitap/kitap bölümü vb.)

1. Kılıç A, Doğan E, Kaya S, Baysallar M: Investigation of the Presence of mecC and Panton valentine Leukocidine Genes in Staphylococcus aureus Strains Isolated from Clinical Specimens During Seven Years Period. Mikrobiol Bul 49(4): 594-599, 2015. KISA BİLDİRİ

2. Kılıç A, Doğan E, Kaya S, Oren S, Tok D, Ardic N, Baysallar M: Rapid Identification of Klebsiella pneumoniae by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry and Detection of

Meropenem Resistance by Flow Cytometric Assay. Journal of clinical Laboratory Analysis.2016; 0(0)1-7.

3. E-poster: ESCMID 2016-Can a flow cytometric method be used to test antibiotic susceptibility in Bacteroides fragilis? A pilot study Nurittin Ardic, Sinem Kaya, Eyup Dogan, Sema Oren, Abdullah Kilic, Mehmet Baysallar Academy, School of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey-EP0319

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. ‘Anaerop Enfeksiyonların Rutin Tanısı’ Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Anaerop Çalışma Grubu ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 18-19 Haziran 2011

2. ‘RNA Tabanlı Moleküler Yöntemler Uygulamalı Eğitim Kursu’ İstanbul Teknik Üniversitesi ve Boğaziçi Üniversitesi Mikrobiyal Ekoloji Grubu (MEG) 26-27 Eylül 2011

3. ‘DNA Tabanlı Moleküler Yöntemler Uygulamalı Eğitim Kursu’ İstanbul Teknik Üniversitesi ve Boğaziçi Üniversitesi Mikrobiyal Ekoloji Grubu (MEG) 24-25 Eylül 2011

4. ‘VIII. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu’ T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, 24-28 Haziran 2013

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar:

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, ‘Anaerop Bakteriyolojide MALDI-TOF MS ve Akım Sitometri Uygulamaları’, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 26 Mart 2018, Ankara

Diğer üyelikleri: