

ANAEROP BAKTERİLERİN TANISINDA ZORLUKLAR VE KLİNİKTE SORUN OLUŞTURAN ANAEROP BAKTERİLER

Nezahat GÜRLER

**İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İSTANBUL**

Anaerop Bakteriyolojide sorunlar

- Örneklerin alınması, laboratuvara ulaştırılması
- Laboratuvarda uygun kültür yöntemlerinin kullanımı, besiyeri seçimi ve hazırlanması
- Anaerop bakterilerin identifikasyonu
- Anaerop bakterilerin antimikrobik maddelere duyarlılıklarının saptanması
- Ücretlerin geri ödenmesinde sorunlar

Anaerop kültürler yapılırken karşılaşılan en önemli sorunlar

- Klinisyenlerin anaerop infeksiyonlara ilgisi
- Örneğin laboratuvara ulaştırılma şekli, süresi, getirdiği ek yük?
- Taze besiyerlerinin teminindeki güçlükler (selektif olan ve olmayan)
- Laboratuvarda çalışan mikrobiyoloğun yeterli deneyimi var mı?

- **Anaerop bakterilerin izolasyon ve identifikasyonunda en önemli sorun zamandır**

Anaerop infeksiyon kuşkusunda örnekler;

- Cary-Blair
- İndirgen maddeli PRAS transport besiyerlerine alınarak laboratuvara gönderilmelidir.

Anaerop kültür için muayene maddelerinin uygunluğu

Uygun olanlar	Uygun olmayanlar
Cerahat ve yaraların derinliğinden alınan örnekler	Yüzeyelyaralardan eküviyonla alınmış örnekler, yanık yaraları, kist sıvısı
Normalde steril olan tüm vücut bölgelerinden ve ülserlerden alınan örnekler alınan örnekler (idrar dışında)	Vajina, serviks ve üretradan alınan örnekler
Suprapubik aspirasyonla alınmış idrar örnekleri	Solunum yolu örnekleri (Bronkoscopi ile alınan örnekler nazofarinkisten eküviyonla alınan örnekler balgam, boğaz salgısı)
Derin dokulardan alınan örnekler	Dışkı ve rektal sürüntü örnekleri
Transtrakeal aspirasyonla alınan örnekler Lokalize abselerden şırıngayla alınan örnekler	Kateterle veya normal şekilde alınan idrar örnekleri
Kuldosentezla alınan örnekler	
Endometrial aspirasyonla uterusdan alınan örnekler	
Pseudomembranöz kuşkusu olduğunda dışkı	

Anaerop bakterilerin mikroskopik incelemesinde yaşanan sorunlar;

Bir çok anaerop bakteri özellikle üredikleri besiyerinin özelliği, kültürün yaşı ile ilgili olarak Gram yöntemiyle boyanan preparasyonda değişik morfoloji de görünür. Gram boyanma özellikleri değişkenlik gösterebilir.

Anaerop kültür için besiyerlerinin seçimi

- Selektif olmayan besiyerleri indirgen madde içeren, bekletilmemiş kanlı besiyerleri
- Selektif besiyerleri
- Kıymalı buyyon, tiyoglikolatlı buyyon gibi besiyerleri

Anaerop bakterilerin izolasyonu için kullanılan selektif besiyerleri

- Kanamisin-vankomisinli besiyerleri
- Fenil etil alkol agar besiyeri
- Vankomisin-paromisinli besiyerleri
- Sikloserin- sefoksitin fruktoz agar
- Safranlı- eskulinli agar

Anaerop koşulların sağlanması

- Anaerop kavonazlar,
: Kavanoz içine gaz karışımı verilmesi (%85 N₂, % 10 H₂, %5 CO₂)
- Gaspak sistemi Disposibl plastik poşetlerin kullanımı
(Bio-Bag sistem B-O, Anaerocult sistem-Merck,
Anaerobic Pouch sistem-katalizörsüz Difco)
- Anaerop kabinler

Anaerop koşulların sağlandığı kavanozlarda kuru ve sulu gaz oluşturan sistemlerde sorunlar var mıdır?

- Sulu sistemlerde ortamın aşırı nemin nedeniyle kontaminasyon riski olabilir?

Fakat Gram negatif bakteriler daha iyi üreme gösteriyor.

- Kuru sistemlerde anaerop kokların üremesi daha iyi.

Anaerop bakterilerin izolasyonu için;

Yeterli süre gerekir (En az 48 saat)

Anaerop bakterilerin identifikasyonunda sorunlar

- Örneklerin alınma ve transportu uygun şekilde yapılmadığında, bakterinin izolasyonu ve identifikasyonu mümkün olmaz.
- Anaerop bakteriler çoğunlukla mikst infeksiyonlardan sorumludur.
- Anaerop bakterilerin üreyebilmesi uzun bir süreye ihtiyaç vardır.
- Bazen geç ve güç üreyen bazı aerop bakteriler, kültürler 48 saatten önce değerlendirildiğinde yanlışlığa neden olabilirler.
- Anaerop kültür işlemlerinin, identifikasyonlarının aerop kültüre oranla maliyetinin fazla olması
- Kültürden birden fazla anaerop bakterilerinin izole edilmesi maliyetleri daha da arttırmaktadır.

Antibiyotik duyarlık deneyleri yapılmasındaki güçlükler

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

CLSI anaerop bakterilerin duyarlık deneylerini belirli durumlarda yapılmasını önermektedir.

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

Anaerop bakterilerde duyarlılık deneyleri için yanıt bekleyen sorular

- Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında rutin olarak her anaerop bakterinin duyarlılığı yapılmalı mıdır?
- Hangi suşlar için duyarlılık deneyi yapılmalıdır?
- Hangi antimikrobik maddeler denenmelidir ?
- Hangi yöntem uygulanmalıdır ?

Duyarlılık deneyleri;

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

CLSI özel durumlarda duyarlılık deneyi yapılmasını önermektedir.

- Beyin absesi
- Endokardit
- Prostetik alet ve vasküler greft infeksiyonlarında
- Eklem infeksiyonları
- Osteomiyelit
- Tekrarlayan bakteriyemiler.

CLSI çalışma grubu virulansı daha fazla ve genellikle antimikrobik maddelere dirençli bazı anaerop bakterilerin duyarlılık deneyi yapılmasını tavsiye etmektedir. Bu mikroorganizmalar;

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

Duyarlılık deneyi için kullanılan yöntemler

- Agar dilüsyon yöntemi (Referans yöntem)
- Dilüsyon yöntemleri (Makro ve mikrodilüsyon)
- Spiral-Gradient-End Point (SGE) yöntemi
- E test

Duyarlılık deneyinde önerilen kontrol suşları

- B.fragilis (ATCC 25285)
- B.thetaiotaomicron (ATCC 29741)
- E.lentum (ATCC 43055)
- Non-toksijenik C.difficile (ATCC 700057)

Klinikte sorun yaratan anaerob bakteriler

- Bacteroides fragilis grubu
- Clostridium difficile

(Bilophila wadsworthia)

Bacteroides fragilis grubunda en önemli sorun;

- Suşların antimikrobik maddelere çoğul dirençli olmalarıdır.

Beta laktam antibiyotiklere direnç oranı
 $\geq$ % 90'dır.

Clostridium difficile'nin bakteriyolojik incelenmesi

<u>İlk deneyler</u>		<u>Ek testler</u>	<u>Sonuç</u>
Kültür	Fekal toksin		
-	-		C.difficile ile ilişkili hastalık yok
+	+		C.difficile ile ilişkili hastalık mevcut
+	-	İn vitro toksijeniliğine bak. Pozitif ise → Negatif ise →	C.difficile ile ilişkili hastalık olabilir. Toksini oluşturmeyen C.difficile taşıyıcılığı
-	+	Kültürü torakatlı CCFA'la tekrarla	C.difficile ile ilişkili hastalık olabilir

- Clostridium difficile ilişkili infeksiyonlarda dışkıda fekal laktoferrin araştırılmasının duyarlılığı % 75-% 90'dır.
- Dışkıda fekal lökositlerin saptanması çok duyarlı bir yöntem değildir (% 28-% 40) fakat çok spesifiktir (% 92).

Dışkıda C.difficile toksini saptama yöntemlerinin karşılaştırılması

Test	Duyarlılık %	Spesifikliği %
Elisa	53.3	100
İki aşamalı algoritma GDH saptama+PCR	100	97

GDH-negatif, toksin A+B pozitif sonuçlar çok nadirdir.

Goldenberg ve ark

J.Clin Microbiol, 2010,48:3048-3049

C. difficile ve toksinlerinin saptanması için kullanılan test ve yöntemler

Saptanan özellik	Metot	Avantajları	Başlıca özelliği
Organizmanın izolasyonu	Toksijenik kültür	Spesifik, Duyarlı	Laboratuvardan laboratuvar etkinliği değişebilir.Toksin mutlaka bakılmalı
GDH	Lateks aglutinasyonu	Çabuk, basit	Duyarlılığı düşük Toksijenik ve non toksijenik suşlar ayırd edilemez.
	Membran ELISA	Çabuk, basit	Duyarlılığı yüksek Toksijenik suşlar ayırdedilmez.24-28 sate ihtiyaç var.Toksin B inaktive olabilir.
Toksin B	Doku kültürü	Duyarlı, spesifik	
Toksin A	ELISA	Basit , çabuk	Duyarlılık ve spesifikliği yüksekA ⁻ /B ⁻ suşlar saptanmaz.
	Membran ELISA	Basit , çabuk	Duyarlılık ve spesifikliği yüksek A-/B ⁺ suşları saptanmaz.
Optik immunoassay	Basit, Çabuk	Elisa'dan daha az duyarlı	
Toksin A-B	ELISA	Basit, çabuk	Duyarlılık ve spesifikliği fazla A-/B ⁺ suşları saptar.
	Membran ELISA	Basit, çabuk	Duyarlılık ve spesifikliği fazla A-/B ⁺ suşları da saptar.

C.difficile ile ilişkili hastalıkların tanısında kullanılan testlerin duyarlılık ve spesifiklikleri

Test	Duyarlılık (%)	Spesifiklik (%)	Klinik kullanım
Endoskopi	51	~100	PMC tanısı
C.difficile kültürü	89-100	84-99	Çok duyarlı, ayrıca toksinin saptanması gerekli
Hücre kültüründe sitotoksin testi	67-100	85-100	CDAD tanısında klinik bulgularla birlikte değerlendirilmeli
ELISA toksin testi	63-99	75-100	CDAD tanısında klinik bulgularla birlikte değerlendirilmeli
C.difficile antijeni için lateks testi	58-92	80-96	Duyarlılığı ve spesifikliği az fakat çabuk sonuç verir
PCR toksin geni saptanması	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Deneme aşamasında

- Ancak son yıllarda toksin saptayan moleküler testlerin (Real Time PCR) duyarlılık ve spesifiklikleri yüksektir. Yakın zamanda bu kitlerle ilgili deneyim ve sonuçlar artacaktır.

Anaerop bakterilerle çalışmak

- Yeterli zaman
- Deneyimli eleman
- Sabır

gerektirir.