Patojen Gram-Pozitif Anaerop Kokların Antimikrobiyal İlaçlara Duyarlılıkları: Türkiye’den Bir Üniversite Hastanesi Verileri

Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic Gram-positive Anaerobic Cocci: Data of a University Hospital in Turkey

Öncü AKGÜL¹(ID), Güner SÖYLETİR¹(ID), Nurver ÜLGER TOPRAK¹(ID)

¹ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ Marmara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-130515-0166 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Makale Atfı: Akgül Ö, Söyletir G, Ülger Toprak N. Patojen gram-pozitif anaerop kokların antimikrobiyal ilaçlara duyarlılıkları: Türkiye’den bir üniversite hastanesi verileri. Mikrobiyol Bul 2020;54(3):404-417.

ÖZ

Büyük bir anaerop bakteri topluluğu olan gram-pozitif anaerop koklar (GPAK), insan deri ve mukozaya yüzeylerinin normal mikrobiyota üyeleridir. Herhangi bir yaralanma sonrasında veya bağışık yanıtın baskılandığı durumlarda invaziv, çoğunlukla mikst enfeksiyonlara neden olabilirler. GPAK, en sık izole edilen anaerop enfeksiyon etkenleri arasında ikinci sırada yer alır. Sınırlı sayıda çalışma olmakla birlikte, GPAK’ların antimikrobiyal ilaçlara direnç geliştirdikleri bildirilmiştir. Antimikrobiyal ilaçlara dirençli patojenlerin uygun olmayan antimikrobiyal ilaçlarla tedavisi başarısız klinik sonuçların alınmasına neden olmaktadır. Bu yüzden merkezlerin periyodik olarak, klinik öneme sahip anaerop bakterileri direnç eğilimleri açısından izlemeleri önerilmektedir. Çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen GPAK’ın antibiyotik duyarlılık durumlarını belirlemek amaçlanmıştır. Çalışmaya 2013-2015 yılları arasında Marmara Üniversite Hastanesinde izole edilen, tekrar etmeyen 100 patojen GPAK alınmıştır. İzolatlar, geleneksel yöntemler, “matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system (MALDI-TOF MS)” (VITEK MS; v3.0, bioMérieux, Fransa) ve 16S rRNA gen dizi analizi ile tanımlanmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testi, “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” önerilerine göre agar dilüsyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testi ile penisilin, amoksisilin/klavulonik asit (AMC), sefoksitin, meropenem, klindamisin, eritromisin, tetrasiklin, tigesiklin, kloramfenikol, moksifloksasin ve metronidazol antibiyotikleri çalışılmıştır. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) sonuçları “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)” sınır değerlerine göre yorumlanmıştır. EUCAST rehberinde MİK sınır değerleri bulunmayan sefoksitin, tetrasiklin ve moksifloksasin için CLSI, tigesiklin için ise “Food and Drug Administration (FDA)” MİK sınır değerleri ölçü alınmıştır. Yüz izolatın beş farklı GPAK; *Parvomonas* (%40), *Finexgoldia* (%34), *Peptoniphilus* (%14), *Peptostreptococcus* (%10) ve *Anaerococcus* (%1) cinsinden oluştuğu saptanmıştır. Mikroorganizmaların tamamı meropenem, tigesiklin ve metronidazole duyarlı bulunmuştur. İzolatların penisilin, AMC, sefoksitin ve kloramfenikole oldukça duyarlı oldukları saptanmış ve duyarlı olmayan izolat oranı %5 veya daha az bulunmuştur. Klindamisin, tetrasiklin ve moksifloksasine

direnç oranları ise sırasıyla; %14, %31 ve %24 olarak belirlenmiştir. İzolatların %11'i çok ilaca direnç göstermiştir. Metronidazol ve tigesiklin GPAC'a karşı yüksek in vitro aktivite göstermişlerdir, her ikisinin ampirik tedavi için seçilecek uygun antimikrobialler olduğunu söyleyebiliriz. Meropenemin etkinliği de yüksek bulunmuş ancak bu antimikrobialin direnç potansiyeline sahip diğer mikroorganizmaların eşlik ettiği ağır mikst enfeksiyonların tedavisinde kullanılmasının daha doğru olacağı izlenmiştir. GPAC enfeksiyonunun tedavisinde sıklıkla kullanılan penisilin ve AMC'ye dirençli izolatların saptanması, GPAC'ın antimikrobiyal duyarlılık paternlerinin periyodik olarak izlenmesini gerekli kılmaktadır. Klindamisin, tetrasiklin ve moksifloksasine karşı yüksek direnç oranları, bu antimikrobiyal ilaçların, etkenin antimikrobiyal duyarlılık sonucu belirlenmeden enfeksiyon tedavisi için kullanılmaması gerektiğini göstermektedir. Bu çalışma, Türkiye'de bugüne kadar yapılmış en fazla GPAC izolatının ele alındığı duyarlılık çalışmasıdır. Sonuçlarımızın gerek hastanemiz gerekse ülkemiz için iyi bir süreyans verisi olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: GPAC; antimikrobiyal duyarlılık; agar dilüsyon; MALDI-TOF MS; 16S rRNA geni.

ABSTRACT

Gram-positive anaerobic cocci (GPAC), a large group of anaerobic bacteria, are the members of the normal microbiota that colonizes the skin and mucosal surfaces of the human body. However, in case of a wound or when the host becomes immunocompromised, GPAC can cause invasive and most frequently mixed infections. GPAC are the second most frequently isolated bacteria in anaerobic infections. Although the studies are limited, GPAC have been reported to develop resistance to antimicrobial drugs. The resistance of the pathogens to the antimicrobials and improper therapy can cause poor clinical outcomes. Therefore, monitoring of the resistance trends of regional clinically important anaerobic bacteria periodically is recommended. In our study, we aimed to determine the antimicrobial susceptibility profiles of clinically important GPAC. A total of 100 non-duplicated pathogenic GPAC isolates were collected from Marmara University Hospital between 2013 and 2015. The isolates were identified by using conventional methods, "matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system (MALDI-TOF MS)" (VITEK MS; v3.0, bioMérieux, France) and 16S rRNA gene sequencing. Antimicrobial susceptibility test was carried out by the agar dilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. The following antimicrobials were tested: penicillin, amoxicillin/clavulanic acid (AMC), cefoxitin, meropenem, clindamycin, erythromycin, tetracycline, tigecycline, chloramphenicol, moxifloxacin and metronidazole. The minimum inhibitory concentration (MIC) results were interpreted according to the breakpoints described by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoints recommended by CLSI for cefoxitin, tetracycline and moxifloxacin, and breakpoint recommended by Food and Drug Administration (FDA) for tigecycline were used since there were no EUCAST breakpoints for these antimicrobials. MIC₅₀ and MIC₉₀ values were determined for erythromycin since the breakpoint was not described by EUCAST, CLSI or FDA guidelines. The identification results showed that the strains (n= 100) consisted of five different GPAC genus; *Parvomonas* (40%), *Finexgoldia* (34%), *Peptoniphilus* (14%), *Peptostreptococcus* (10%) and *Anaerococcus* (1%). All of the organisms were susceptible to meropenem, tigecycline and metronidazole. The isolates were highly susceptible to penicillin, AMC, cefoxitin, and chloramphenicol, since the resistance rates against these antimicrobials were 5% or less. The resistance rates against clindamycin, tetracycline and moxifloxacin were 14%, 31% and 24%, respectively. In total, 11% of the isolates were multidrug resistant. Metronidazole and tigecycline displayed high in vitro activity against GPAC and both are appropriate antimicrobials for the selection of empiric therapy. The effectiveness of meropenem was also found high, but it was observed that this antimicrobial would be more appropriate to use in the treatment of severe mixed infections accompanied by other microorganisms with the resistance potential. Detection of penicillin and AMC resistant isolates, which are frequently used in the treatment of GPAC infection, requires periodic monitoring of the antimicrobial susceptibility patterns of GPAC. The high rates of resistance against clindamycin, tetracycline and moksifloxacin indicated that these antimicrobials should not be used for empirical treatment of infections without prior antimicrobial susceptibility testing. This study is one of the largest susceptibility studies specifically carried out on GPAC to date in Turkey. We believe that our results will provide good surveillance data both for our hospital and our country.

Keywords: GPAC; antimicrobial susceptibility; agar dilution; MALDI-TOF MS; 16S rRNA gene.

GİRİŞ

Gram-pozitif anaerob koklar (GPAK), kommensal mikrobiyotanın önemli bir kısmını oluşturur. Günümüzde tanımlanmış GPAK'lara ait 13 cins (*Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Finegoldia*, *Parvimonas*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Gallicola*, *Murdochella*, *Atopobium*, *Anaerosphaera*, *Coproccoccus*, *Sarcina*, *Blautia*) bulunmaktadır. GPAK'lar deri veya mukoza bütünlüğünün bozulduğu durumlarda steril vücut bölgelerine ulaşarak endojen kaynaklı enfeksiyonlara yol açabilir. Klinik örneklerden izole edilen anaerob bakterilerin yaklaşık %25-30'unu oluştururlar. Sıklıkla enfeksiyona yol açmalarına karşın literatürde GPAK'larla ilgili çalışmalar sınırlıdır¹.

GPAK'lar oksijene son derece duyarlı mikroorganizmalardır. Bu nedenle gerek klinik örneklerin alınması ve taşınmasında, gerekse üretilmelerinde özel anaerob koşulların sağlanması gereklidir. Ancak tanı laboratuvarlarının birçoğunda anaerob taşıma sistemi ve anaerob bakterilerin üretilmesi için anaerob ortam bulunmamaktadır. Ayrıca bu mikroorganizmaların üremelerinin yavaş olması ve tanımlanmalarında kullanılan fenotipik yöntemlerin uzun zaman alması GPAK'larla ilgili çalışmaların kısıtlı olmasında önemli etkidir. Diğer yandan, GPAK'lar genellikle diğer mikroorganizmalarla beraber mikst enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Mikst kültür ortamında hızlı üreyen ve daha büyük koloniler oluşturan bakterilerin arasında küçük kolonilere sahip GPAK'ların gözden kaçması da diğer bir sınırlayıcı etkidir^{2,3}.

Sınırlı sayıda çalışma yapılmış olsa da, dünya genelinde sıklıkla izole edilen GPAK'ların bazı antibiyotiklere önemli oranda direnç geliştirdikleri saptanmıştır. Direnç oranları, coğrafi bölgelere, merkezlere, hatta aynı merkezde bulunan farklı servislere göre ve enfeksiyon türlerine göre farklılıklar göstermektedir. GPAK'ların türler arasında da antimikrobiyal direnç oranları bakımından farklılıklar sergiledikleri tespit edilmiştir^{4,5}.

Yapılan çalışmalarda, GPAK enfeksiyonlarına neden olan izolatlar çoğunlukla tür ayrımına gitmeksizin ele alınmış ya da çok az sayıda tür tayini yapılmıştır^{4,5}. Diğer yandan, GPAK'larda son zamanlarda halen devam etmekte olan büyük taksonomik değişiklikler yapılmıştır⁶⁻⁹. Taksonomiye yeni katılan izolatların antibiyotiklere direnç profili ise henüz bilinmemektedir. GPAK izolatlarının tür düzeyinde antimikrobiyal duyarlılık paternlerinin saptanması gerekli olup bu durum etkili bir ampirik tedavi açısından çok önemlidir.

Bu çalışmada, hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden elde edilen enfeksiyon etkeni GPAK izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 26.01.2015 ve Karar No: 23).

İzolatların Tanımlanması

Çalışmaya 2013-2015 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi hastalarına ait klinik örneklerden elde edilen GPAK izolatları alındı. Apse (n= 35), doku biyopsisi (n= 30), batin içi apse örneği (n= 17), periton sıvısı (n= 7), plevra sıvısı (n= 6), kan (n= 4) ve eklem sıvısı (n= 1) örneklerinden üretilen ve tekrar etmeyen 100 patojen GPAK çalışmaya dahil edildi. Antibiyotik duyarlılık testi öncesi -80°C’de saklanan izolatlar, koyun kanı, K vitamini ve hemin ile zenginleştirilmiş *Brucella* agara ekildi. Mikroskopik olarak gram-pozitif kok görünümünde olan, aerotolerans testine göre zorunlu anaerob özellik gösteren izolatlar tanımlamaya alındı.

“Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system (MALDI-TOF MS)” ile Tanımlama

İzolatların tür düzeyinde tanımlanmaları VITEK® MS (bioMerieux, Fransa) analiz yöntemiyle gerçekleştirildi. Bakteri kültüründen birer koloni MALDI-TOF MS (VITEK MS; v3.0, bioMerieux, Fransa) slaytı üzerine yayılarak, üzerlerine 1 µl matris çözeltisi (2,5-dihidroksibenzoik asit ve α-siyano-4-hidroksisinnamik asit) damlatıldı ve kurumaya bırakılarak cihaza yerleştirildi. Elde edilen kütle spektrumları sistemin V3.0 bilgi veri tabanındaki spektrumlarla karşılaştırılarak bakteriler tanımlandı. Sistemin kalibrasyonu ve bakterilerin tanımlanma kontrolü için ATCC *Escherichia coli* 8739 suşu kullanıldı.

16S rRNA Geni Dizilemesi ile Tanımlama

İzolatların tür tanımlanması 16S rRNA gen dizi analizi ile doğrulandı. Bakteri DNA’sı kaynatma yöntemiyle elde edildikten sonra, 16S rRNA genini kodlayan bölge evrensel 8UA (5’-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3’) ve 907B (5’-CCG TCA ATT CMT TTA GTT T-3’) primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edildi¹⁰. Elde edilen PCR ürünleri dizi analizi ile incelendi (Triogene). Dizi analizi sonuçları NCBI-Blast veri tabanı kullanılarak incelendi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Zenginleştirilmiş *Brucella* agarda üç kez peş peşe pasajlanarak canlandırılan GPAK izolatlarına antibiyotik duyarlılık testi uygulandı. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI: M11-A7)” önerileri doğrultusunda agar dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlendi¹¹. Antimikrobiyal ilaçlar CLSI ve “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)” önerileri dikkate alınarak belirlendi^{11,12}. K vitamini, hemin ve koyun kanı ile zenginleştirilmiş *Brucella* agar kullanılarak; penisilin G, amoksisilin/klavulanik asit, sefoksitin, meropenem, tetrasiklin, tigesiklin, eritromisin, klindamisin, metronidazol, kloramfenikol ve moksifloksasin antibiyotiklerinin her biri için seri dilüsyonlarda agar dilüsyon plakları hazırlandı. Bakterilerin *Brucella* sıvı besiyerinde bir gecelik inkübasyonu sonrası elde edilen taze kültürlerinden, son konsantrasyon 10⁵ cfu olacak şekilde, agar dilüsyon plaklarına ekim yapıldı. Anaerob ortamda, 37°C’de 48 saat inkübasyonun ardından üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak kabul edildi.

Tüm izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları, hem CLSI hem de EUCAST dokümanlarına göre değerlendirildi. Öncelikle EUCAST dokümanında yer alan sınır değerler dikkate alındı. Bu rehberde belirtilmeyen antibiyotik duyarlılık sınır değerleri için CLSI önerileri dikkate alındı. Her iki dokümanda da anaerobik bakterilerde sınır değeri verilmeyen eritromisin için MİK aralıkları ve MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri olarak hesaplandı. Tigesiklin için ise "Food and Drug Administration (FDA)" tarafından önerilen sınır değerler (duyarlı: ≤ 2 mg/L, dirençli: ≥ 8 mg/L) dikkate alındı¹³.

Beta-laktamaz aktivitesinin varlığını araştırmak için kromojenik sefalosporin testi (BBL DrySlide Nitrocefın, BD, ABD) kullanıldı⁴.

BULGULAR

VITEK MS (bioMérieux, Fransa) ile yapılan tanımlamada izolatların %41'i *Parvomonas micra*, %34'ü *Finegoldia magna*, %14'ü *Peptoniphilus asaccharolyticus* ve %10'u *Peptostreptococcus anaerobius* olarak %99.9 kesinlikte tanımlanmıştır. Bir izolat ise tanımlanamamıştır.

16S rRNA gen dizi analizine göre izolatların 41'i %99 benzerlikle *P.micra*, 34'ü %99 benzerlikle *F.magna* olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlar MALDI-TOF MS sonuçlarıyla aynı bulunmuştur. Diğer izolatlardan 14'ü *P.asaccharolyticus* ve *Peptoniphilus harei* türlerine %99 benzerlik göstermiştir; bu izolatlar MALDI-TOF MS ile %99.9 olasılıkla *P.asaccharolyticus* şeklinde identifiye edilmiştir. Toplam 10 izolat ise *P.anaerobius* ve aynı zamanda *Peptostreptococcus stomatis*'e %99 benzer bulunmuştur. MALDI-TOF MS ile bu izolatlar *P.anaerobius* olarak değerlendirilmiştir.

MALDI-TOF MS ile tanımlanamayan bir izolat 16S rRNA gen dizilemesi ile %91 oranıyla *Anaerococcus octavius* (NR_026360.1) izolatı ile benzer bulunmuştur. Tanımlanan izolatların izole edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı Tablo I'de verilmiştir.

Çalışmaya alınan izolatların %42'si tüm antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur. GPAK türlerinin 11 antimikrobiyal ilaca karşı duyarlılık profilleri, antibiyotiklerin MİK sınır değerleri, MİK₅₀ ve MİK₉₀ verileri Tablo II'de gösterilmiştir. İzolatların tamamı sefoksitine (orta dirençli bir izolat hariç), meropeneme, tigesikline ve metronidazole duyarlı bulunmuştur. Penisiline %5, amoksisilin/klavulonik aside %4, diğer antibiyotiklerden kloramfenikol, klindamisin, moksifloksasin ve tetrasikline ise sırasıyla; %3, %14, %24 ve %31 oranlarında direnç saptanmıştır.

Dirençin türlere göre dağılımı irdelendiğinde, türler arasında farklılıklar gözlenmiştir. *P.micra* izolatlarının çoğu antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur. Buna karşın, *Peptoniphilus* türlerinde en yüksek direnç oranları tetrasikline (%93) ve klindamisine (%29) karşı gözlenmiştir. Genel anlamda peptostreptokok türlerinde antibiyotiklere yüksek direnç oranı tespit edilmiştir (Tablo III). İzolatların %11'i üç veya daha fazla grup antibiyotiğe direnç göstermiştir (Tablo IV). Çok antibiyotiğe dirençli izolatlar sırasıyla *F.magna* (n= 5), *Peptostreptococcus* (n= 4) ve *Peptoniphilus* (n= 2) türlerinden oluşmuştur. Penisiline dirençli izolatlar beta-laktamaz aktivitesi göstermemiş olmakla birlikte diğer antibiyotiklere de direnç göstermiştir.

Tablo 1. Türlerin İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılımı

Türler	16S rRNA gen dizileme ile	VITEK MS ile	Apse	BİA*	Periton	Plevra	Kan	Eklem sıvısı	Doku/biyopsi	Sayı (n)
<i>F.magna</i>		<i>F.magna</i>	10	5	-	3	-	1	15	34
<i>P.micra</i>		<i>P.micra</i>	15	8	3	3	3	-	9	41
<i>Peptoniphilus</i> spp.		<i>P.saccharolyticus</i>	5	2	2	-	1	-	4	14
<i>Peptostreptococcus</i> spp.		<i>P.anaerobius</i>	4	2	2	-	-	-	2	10
GPAK		GPAK	1	-	-	-	-	-	-	1
Toplam (n)			35	17	7	6	4	1	30	100

BİA: Batın içi apse, GPAK: Gram-pozitif anaerob koklar.

Tablo II. GPAK'ların Genel Olarak Antibiyotiklere Duyarlılık Profilleri, Mik Sınır Değerleri, Mik Aralıkları, Mik₅₀ ve Mik₉₀ Verileri										
Antimikrobiyaller	Sınır değerler			Mik değerleri				Duyarlı (%)	Dirençli (%)	Duyarlı olmayan* (%)**
	Duyarlı	Orta	Dirençli	Mik aralığı	Mik₅₀	Mik₉₀				
Penisilin G	≤ 0.25		> 0.5	0.007-8	0.062	0.25	95	5		5
AMC	≤ 4/2		> 8/2	0.007/2-8/2	0.062/2	0.5/2	96	4		4
Sefoksitin	≤ 16	32	≥ 64	0.062-32	1	8	99	0		1
Meropenem	≤ 2		> 8	0.007- 4	0.062	0.25	100	0		0
Klindamisin	≤ 4		> 4	0.007-32	0.5	> 32	86	14		14
Eritromisin	VY		VY	0.5-> 64	2	> 64	-	-		-
Tetrasiklin	≤ 4	8	≥ 16	0.062-32	1	32	66	31		34
Tigesiklin	≤ 4	8	≥ 16	0.007-8	0.25	0.5	100	0		0
Kloramfenikol	≤ 8		> 8	0.007-32	2	8	97	3		3
Moksifloksasin	≤ 2	4	≥ 8	0.007-64	1	16	61	24		39
Metronidazol	≤ 4		> 4	0.031-32	0.5	1	100	0		0
* Duyarlı olmayan sütunu içinde orta dirençli ve dirençli kökenler birlikte yer almaktadır.										
** % oranı ile köken sayısı (n) aynıdır (n= %).										
GPAK: Gram-pozitif anaerob koklar, Mik: Minimum inhibitör konsantrasyonu, AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, VY: Veri yok.										

Tablo III. GPAK'ların Tür Düzeyinde Direnç Profilleri, Antimikrobiyallerin MİK Aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ Verileri

GPAK ve antimikrobiyaller	MİK değerleri			Oran %	
	MİK aralıkları	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Duyarlı	Duyarlı olmayan
<i>Parvimonas micra</i> (n= 41)					
Penisilin	< 0.007-0.125	< 0.007	0.031	100	0
AMC	< 0.007/2 - 1/2	0.007	0.125	100	0
Klindamisin	< 0.007-8	0.125	0.5	95.1	4.9
Tetrasiklin	0.062-32	0.125	1	97.6	2.4
Kloramfenikol	0.007-8	1	2	100	0
Moksifloksasin	0.015-8	1	4	83	17
<i>Fingoldia magna</i> (n= 34)					
Penisilin	0.015-0.5	0.15	0.25	100	0
AMC	0.062/2-0.5/2	0.125	0.5	100	0
Klindamisin	< 0.007-> 32	2	> 32	79.4	20.6
Tetrasiklin	0.062-32	2	32	61.8	38.2
Kloramfenikol	1-32	4	8	94.1	5.9
Moksifloksasin	0.25-> 32	4	32	38.2	61.8
<i>Peptoniphilus spp.</i> (n= 14)					
Penisilin	0.031-2	0.15	0.25	92.8	7.1
AMC	< 0.007/2-2/2	0.007	0.062	100	0
Klindamisin	0.31-> 32	1	> 32	71.4	28.6
Tetrasiklin	0.062-64	32	64	21.4	92.9
Kloramfenikol	0.031-8	2	2	100	0
Moksifloksasin	0.05-64	1	64	71.4	28.6
<i>Peptostreptococcus spp.</i> (n= 10)					
Penisilin	< 0.007-8	0.25	4	60	40
AMC	0.125/2-8/2	0.5	> 8	60	40
Klindamisin	0.062-8	0.125	2	90	10
Tetrasiklin	0.062-32	16	32	10	90
Kloramfenikol	1-> 32	1	2	90	10
Moksifloksasin	0.25-16	16	16	30	70

GPAK: Gram-pozitif anaerob koklar, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, AMC: Amoksisilin/klavulonik asit.

Tablo IV. Çok Antimikrobiyale Dirençli Organizmaların Duyarlı Olmadıkları Antimikrobiyaller							
GPAK türleri	Penisilin	Amoksisilin/klavulonik asit	Sefoksitin	Klindamisin	Tetrasiklin	Kloramfenikol	Moksifloksasin
<i>Finegoldia magna</i>				X	X		X
<i>Finegoldia magna</i>				X	X		X
<i>Finegoldia magna</i>				X	X		X
<i>Finegoldia magna</i>					X	X	X
<i>Finegoldia magna</i>				X	X	X	X
<i>Peptoniphilus</i> spp.	X				X		X
<i>Peptoniphilus</i> spp.				X	X		X
<i>Peptostreptococcus</i>					X	X	X
<i>Peptostreptococcus</i>	X	X		X	X		X
<i>Peptostreptococcus</i>	X	X	X		X		X
<i>Peptostreptococcus</i>	X	X			X		X

GPAK: Gram-pozitif anaerop koklar.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, 2013-2015 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi Laboratuvarında klinik örneklerden elde edilen GPAK izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık durumları araştırılmıştır. Elde edilen veriler üç unsuru öne çıkartmıştır: (i) İzolatlarımız dört ana GPAK cinsini içermekte olup cinsler arasında antibiyotiklere duyarlılık profili çeşitlilik göstermektedir; en fazla orana sahip *Parvomonas* izolatları diğer türlere göre daha duyarlı bulunmuştur. (ii) Klindamisin, tetrasiklin ve moksifloksasine yüksek oranda direnç saptanmıştır. (iii) İzolatların %11'i üç veya daha fazla grup antimikrobiyal ilaca direnç göstermiştir.

Bu çalışma sonuçları, bu konuda yayımlanmış diğer direnç verileriyle karşılaştırıldığında değerlendirilmede birtakım zorluklar fark edilmiştir. Türkiye'den, GPAK'ların antibiyotiklere duyarlılıklarını referans yöntemlerle araştırarak herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak 2010 yılında Doğan ve arkadaşları tarafından yapılan klinik örneklerden izole edilen anaerob bakterilerin ele alındığı, gradient test (AB Biodisk, İsveç) yöntemiyle penisilin G, klindamisin, sefoksitin, metronidazol, piperasilin/tazobaktam ve imipeneme karşı duyarlılıklarının araştırıldığı çalışmada¹⁴, GPAK izolatlarının (n= 7) çalışılan antibiyotiklere duyarlı olduğu bulunmuştur. Dünya verileri incelendiğinde ise, çalışmalarda farklı duyarlılık yöntemlerinin kullanıldığı, farklı antibiyotiklerin test edildiği veya sonuçları değerlendirmek için farklı rehberlerin (CLSI/EUCAST) sınır değerlerinin alındığı, bazı çalışmalarda ise sadece Mik_{50} ve Mik_{90} değerlerinin verildiği görülmüştür¹⁵⁻¹⁹. Çalışmamızda anaerob bakterilerin duyarlılıklarını saptamak için CLSI tarafından önerilen standart yöntem olan agar dilüsyon testi uygulanmış ve anaeroplara üzerine etkili olduğu bilinen antimikrobiyal ilaçlar çalışılmıştır¹¹.

Klinik örneklerden GPAK türlerinin izole edilme oranlarında merkezlere göre farklılıklar gözlenmektedir. On Avrupa ülkesini kapsayan, daha çok yumuşak doku enfeksiyonu etkenlerinden oluşan 299 GPAK'ın ele alındığı ve 2008 yılında yayımlanmış çok merkezli bir çalışmada²⁰ izolatların çoğunluğunu *F.magna* (%37.1) oluşturmuş, bunu sırasıyla *P.micra* (%17.7), *P.harei* (%14.7), *A.vaginalis* (%7.0) ve *P.anaerobius* (%6.7) izlemiştir. Kanser hastalarından izole edilen GPAK'ların test edildiği bir başka çalışmada²¹, *F.magna* (%47) birinci sırada yer almış, bunu *P.harei* (%28), *P.micra* ve *P.anaerobius* izlemiştir. Çalışmamızda *P.micra* en fazla sayıda izole edilmiş, *F.magna* ise ikinci sırada yer almıştır. Test edilen klinik örneğin cinsine göre izole edilen GPAK türlerinde farklılıklar gözlenebilmektedir. Çalışmalar irdelendiğinde *P.micra* daha çok batin içi enfeksiyonlarında ve steril vücut sıvılarından izole edilmiştir. Çalışmamızda *P.micra* izolatlarının önemli kısmı (n= 17) batin içi apselerinden olmak üzere kan, plevra ve periton sıvıları gibi klinik örneklerden üretilmiştir¹. *Peptoniphilus* izolatları için VITEK MS %99.9 doğrulukla *P.asaccharolyticus* olarak tanımlarken, 16S rRNA gen dizilemesi aynı izolat için iki *Peptoniphilus* türüne %99 benzerlikle *P.asaccharolyticus* ve *P.harei* sonucunu vermiştir. Wildeboer-Veloo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada²², enfeksiyon etkeni olan GPAK türlerinin 16S rRNA gen dizi analizi ile tanımlamada aynı sorunlarla karşılaşmışlardır. Araştırmacılar bunu, fenotipik özellikleri bakımından benzerlik gösteren iki *Peptoniphilus* izolatından *P.harei*'nin yanlışlık-

la *P.asaccharolyticus* olarak tanımlanabileceği şeklinde yorumlamışlardır. Hatta gen bankasına yanlışlıkla *P.hare*'ye ait bilgilerin *P.asaccharolyticus*'a ait bilgiler şeklinde girilmiş olabileceğini ileri sürmüşlerdir²³.

Antibiyotiklere duyarlılık sonuçları temel alınarak sonuçlarımız değerlendirildiğinde, dünya verileriyle benzerlikler ve farklılıklar sergiledikleri görülmektedir. Dördü *P.anaerobius*, biri *Peptoniphilus* türü olmak üzere izolatlarımızın 5 (%5)'i penisiline dirençli bulunmuştur. *P.anaerobius* izolatlarının aynı zamanda amoksisilin/klavulonik aside direnç, sefoksitine ise yüksek MİK değeri (birisi orta dirençli) geliştirdiği gözlenmiştir. Penisiline dirençli izolatların hiçbirinde beta-laktamaz aktivitesi saptanmamıştır. Bazı ülkelerde GPAK izolatlarında %4 ile %15'lere varan oranda penisiline direnç bildirilmiştir. Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörlerine ise yaklaşık %3 oranında direnç bildirilmiştir^{15-18,20}. Saptanan direncin beta-laktamaz üretimine bağlı olmayıp, penisilin bağlayan hedef bölgelerdeki değişimlerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. İzolatlarımızdaki direnç profili göz önüne alındığında aynı direnç mekanizmasının rol oynadığını söyleyebiliriz. Diğer çalışmalarda olduğu gibi izolatlarımızın tamamı meropeneme duyarlı bulunmuştur.

Penisiline allerjisi olan kişilerde geniş antianaerob etkiye sahip klindamisin kullanılmaktadır. Klindamisin özellikle diş ve dişeti enfeksiyonları ve aspirasyon pnömonisi tedavisinde başarılı sonuçlar vermektedir. Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda, GPAK izolatlarında %7-20 oranında klindamisine direnç bildirilmiştir^{15-18,20,21}. Ancak %55 ile en yüksek direnç oranı Tayvan'dan açıklanmıştır²⁵. İzolatlarımızın tamamı değerlendirildiğinde direnç oranımız %14 saptanmış, bununla beraber türler arasında farklılıklar görülmüştür. Direnç oranı *Peptoniphilus* izolatlarında daha yüksek bulunmuştur.

Hastanemizde genel anlamda GPAK'ların tetrasikline direnç oranı %31, tür düzeyinde irdelendiğinde ise *Peptostreptococcus* ve *Peptoniphilus* izolatlarının %90'ından fazlasında direnç saptanmıştır. Tetrasiklin ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı olmakla birlikte İngiltere'de GPAK izolatlarının %41.6'sında, tür bazında ise *Peptostreptococcus* ve *P.micra* izolatlarının %60'ında direnç bildirilmiştir¹⁶. Tetrasiklinin anaeroplara üzerine etkisi zayıf olmakla birlikte, tetrasiklinin bir analogu olan tigesiklin gerek GPAK izolatları gerekse diğer anaeroplara üzerine yüksek etkiye sahiptir. Avrupa çapında yapılan bir çalışmada GPAK izolatlarının tamamının tigesikline duyarlı, MİK₉₀ değerinin ise 0.12 mg/L olduğu saptanmıştır²⁷. Benzer şekilde izolatlarımızın tamamı tigesikline duyarlı bulunmuştur.

Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda GPAK izolatları arasında florokinolonlara giderek artan ve %14-27 arasında değişen direnç oranları bildirilmiştir⁵. Belçika'da yapılan bir çalışmada, 37 GPAK izolatı arasında moksifloksasin direnci %22 olarak saptanmıştır¹⁸. Başka bir çalışmada ise levofloksasine direnç, *P.micra* izolatlarında %8.9, *F.magna* izolatlarında %27.6 oranında bulunmuştur²⁶. Çalışmamızda moksifloksasine direnç GPAK izolatlarının %39'unda saptanmıştır. En yüksek direnç *Peptostreptococcus* izolatlarında (%60) bulunurken, *F.magna* izolatlarında %41.1 oranında direnç izlenmiştir. Direnç oranının yüksek olması florokinolonların çeşitli enfeksiyonların tedavisinde yaygın kullanılıyor olmasına bağlanabilir.

Toksik yan etkileri nedeniyle pek kullanılmayan kloramfenikole karşı dirençli izolatlarımızın bulunması dikkat çekicidir. Diğer ülkelere ait veriler incelendiğinde yalnız Belçika'dan yıllar içinde %1-3 oranında değişen direnç bildirilmiştir²⁸.

Anaeroplara bağlı enfeksiyonların tedavisinde sık kullanılan metronidazole karşı tüm izolatlarımızın duyarlı olması yüz güldürücüdür. Dünya verileri incelendiğinde, GPAK izolatlarının en az %90-95'inin metronidazole duyarlı olduğu görülmektedir⁵. Dünyada *nim* geni taşıyan metronidazole dirençli *F.magna* ve *P.micra* izolatları tanımlanmış²⁹ ve en yüksek direnç oranı %28.6 ile Hırvatistan'dan bildirilmiştir³⁰.

Çoklu antibiyotik dirençli izolatlarımızın oranı kaygı verici boyutlardadır. Bu konuda yapılmış, özellikle çok ilaca dirençli GPAK'ların ele alındığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, *F.magna* izolatlarının diğerlerine göre daha dirençli olduğuna dair bilgi bulunmaktadır²¹. Çalışmamızda *F.magna* ve *Peptostreptococcus* türlerinin her ikisi çok ilaca dirençli izolatlar arasında önemli paya sahiptir.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz veriler GPAK enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde uygun antibiyotigi seçmemiz için yol gösterici olacaktır. Çalışmamızda meropenem, tigesiklin ve metronidazol ampirik tedavide güvenle kullanabileceğimiz en etkili antimikrobiyal ilaçlar olmuştur; ancak meropenemin direnç potansiyeline sahip diğer organizmaların eşlik ettiği ağır mikst enfeksiyonların tedavisine ayrılması daha doğru olacaktır. GPAK'lara bağlı enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılan penisilin ve amoksisilin/klavulonik aside dirençli izolatlarımız bulunmaktadır, Bu mikroorganizmalar diğer antibiyotiklere de direnç göstermektedir. İzolatlarımızda klindamisin, tetrasiklin ve moksifloksasine yüksek düzeylerde direnç bulunması, ampirik tedavide bu ilaçların seçilmesine engel teşkil etmektedir. Başarılı bir tedavinin yapılabilmesi için etken mikroorganizmanın tür düzeyinde tanımlanması ve duyarlılık durumlarının belirlenmesi gerekmektedir.

Türkiye'de bugüne kadar yapılmış en yüksek sayıda GPAK izolatına sahip antibiyotik duyarlılık sonuçlarını sunması nedeniyle çalışmamızın, hastanemiz ve ülkemiz için iyi bir sürveyans verisi olacağı düşüncesindeyiz.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 26.01.2015 ve Karar No: 23).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Murphy EC, Frick IM. Gram-positive anaerobic cocci-commensals and opportunistic pathogens. FEMS Microbiol Rev 2013; 37(4): 520-53.
2. Tunçkanat F. Anaerob bakterilerin genel özellikleri, pp: 2319-63. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2. 2008, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.

3. Song Y, Liu C, Finegold SM. Development of a flow chart for identification of gram-positive anaerobic cocci in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2007; 45(2): 512-6.
4. Brook I, Wexler MH, Ellie JC, Goldstein EJC. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2013; 26(3): 526-46.
5. Schuetz AN. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. Clin Infect Dis 2014; 59(5): 698-705.
6. Murdoch DA. Gram-positive anaerobic cocci. Clin Microbiol Rev 1998; 11(1): 81-120.
7. Ezaki T, Kawamura Y, Li N, Li ZY, Zhao L, Shu S. Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. For members of the genus *Peptostreptococcus*. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51(Pt 4): 1521-8.
8. Ezaki T, Kawamura Y, Li N, Li ZY, Zhao L, Shu S. Transfer of *Peptococcus indolicus*, *Peptococcus asaccharolyticus*, *Peptococcus prevotii* and *Peptococcus magnus* to the genus *Peptostreptococcus* and proposal of *Peptostreptococcus tetradius* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1983; 33: 683-98.
9. Ulger-Toprak N, Liu C, Summanen PH, Finegold SM. *Murdochella asaccharolytica* gen. nov., sp. nov., a gram-stain-positive, anaerobic coccus isolated from human wound specimens. Int J Syst Evol Microbiol 2010; 60(Pt 5): 1013-6.
10. Song Y, Liu C, McTeague M, Finegold SM. 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram positive anaerobic cocci. J Clin Microbiol 2003; 41(4): 1363-9.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteri, Approved Standards-7th Edition, M11-A7, CLSI, Pennsylvania, USA, 2007.
12. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2015. Setting breakpoints for existing antimicrobial agents. EUCAST SOP 2.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Växjö, Sweden.
13. FDA (2005). FDA approved drug products: Tygacil. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/021821lbl.pdf
14. Doğan M, Baysal B. Identification of anaerobic bacteria isolated from various clinical specimens and determination of antibiotic susceptibilities. Mikrobiyol Bul 2010; 44(2): 211-9.
15. Boyanova L, Osmanliev D, Petrov D, Mitov I, Usunova I, Petrov S, et al. Anaerobic cocci and their resistance patterns to penicillin, cefoxitin, clindamycin and metronidazole: a Bulgarian study. Clin Microbiol Infect 2000; 6(11): 623-4.
16. Brazier JD, Hall V, Morris TE, Gal M, Duerden BI. Antibiotic susceptibilities of gram-positive anaerobic cocci: results of a sentinel study in England and Wales. J Antimicrob Chemother 2003; 52(2): 224-8.
17. Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT. Comparative in vitro susceptibilities of 396 unusual anaerobic strains to tigecycline and eight other antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(10): 3507-13.
18. Wybo I, Pierard D, Verschraegen I, Reynders M, Vandoorslaer K, Claeys G, et al. Third Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. J Antimicrob Chemother 2007; 59(1): 132-9.
19. Veloo AC, Welling GW, Degener JE. Antimicrobial susceptibility of clinically relevant gram-positive anaerobic cocci collected over a three-year period in the Netherlands. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(3): 1199-203.
20. Brazier J, Chmelaer D, Dubreuil L, et al; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. European surveillance study on antimicrobial susceptibility of Gram-positive anaerobic cocci. Int J Antimicrob Agents 2008; 31(4): 316-20.
21. Shilnikova II, Dmitrieva NV. Evaluation of antibiotic susceptibility of gram-positive anaerobic cocci Isolated from cancer patients of the N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center. J Pathog 2015; 2015: 648134.
22. Wildeboer-Veloo AC, Harmsen HJ, Welling GW, Degener JE. Development of 16S rRNA-based probes for the identification of Gram-positive anaerobic cocci isolated from human clinical specimens. Clin Microbiol Infect 2007; 13 (10): 985-92.

23. Veloo AC, Welling GW, Degener JE. Mistaken identity of *Peptoniphilus asaccharolyticus*. J Clin Microbiol 2011; 49(3): 1189.
24. Nagy E. Anaerobic infections update on treatment considerations. Drugs 2010; 70(7): 841-58.
25. Teng LJ, Hsueh PR, Tsai JC, Liaw SJ, Ho SW, Luh KT. High incidence of cefoxitin and clindamycin resistance among anaerobes in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(9): 2908-13.
26. Koeth LM, Good CE, Appelbaum PC, Goldstein EJ, Rodloff AC, Claros M, et al. Surveillance of susceptibility patterns in 1297 European and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxiclav and five other antimicrobial agents. J Antimicrob Chemother 2004; 53(6): 1039-44.
27. Nagy E. In vitro activity of tigecycline and comparators against European compilation of anaerobes collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST). Scand J Infect Dis 2010; 42(1): 33-8.
28. Wybo I, Van den Bossche D, Soetens O, Vekens E, Vandoorslaer K, Claeys G, et al. Fourth Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. J Antimicrob Chemother 2014; 69(1): 155-61.
29. Alauzet C, Lozniewski A, Marchandin H. Metronidazole resistance and nim genes in anaerobes: a review. Anaerobe 2019; 55: 40-53.
30. Novak A, Rubic Z, Dogas V, Goic-Barisic I, Radic M, Tonkic M. Antimicrobial susceptibility of clinically isolated anaerobic bacteria in a university hospital centre Split, Croatia in 2013. Anaerobe 2015; 31: 31-6.