

İstanbul'da İki Merkeze ait *Prevotella* Türlerinin Gradyent Test Yöntemiyle Belirlenen Antimikrobiyal İlaç Duyarlılığı

Antimicrobial Susceptibility Profiles of *Prevotella* Species Determined by Gradient Test Method in Two Centers in Istanbul

Nurver ÜLGER TOPRAK¹(ID), Öncü AKGÜL¹(ID), Güven KÜLEKÇİ²(ID), Güner SÖYLETİR¹(ID)

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

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

² İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, İstanbul.

² Istanbul University Faculty of Dentistry, Department of Microbiology, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışma, "The 14th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas" Kongresi (9-12 Temmuz 2018, Amerika Birleşik Devletleri)'nde bildiri olarak sunulmuş ve kısmen ESCMID Anaerob Enfeksiyonlar Çalışma Grubu (ESGAI)'nun sağladığı araştırma bursuyla desteklenmiştir.

Makale Atfı: Ülger Toprak N, Akgül Ö, Külekçi G, Söyletir G. İstanbul'da iki merkeze ait *Prevotella* türlerinin gradyent test yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal ilaç duyarlılığı. Mikrobiyol Bul 2020;54(2):246-256.

ÖZ

Prevotella türleri, insan mikrobiyotasının üyeleri arasında yer alan zorunlu anaerob gram-negatif basillerdir. Bu bakteriler çoğunlukla ağızda olmak üzere, lokal veya sistemik fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilir. *Prevotella* türleri arasında bazı antimikrobiyal ilaçlara karşı önemli direnç artışı tespit edilmiştir. Direnç oranları, enfeksiyon kaynaklarına ve coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. Türkiye'de *Prevotella* türlerinin antimikrobiyal ilaçlara duyarlılıklarıyla ilgili bilgi sınırlıdır. Bu bakterilerin antimikrobiyal ilaçlara duyarlılık verilerinin sağlanması, etkili ampirik tedavi için çok önemlidir. Bu çalışmada, Türkiye'de iki merkezden toplanan, *Prevotella* izolatlarının 12 antimikrobiyal ilaca karşı duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ocak 2014-Aralık 2017 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ve İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Mikrobiyolojisi Laboratuvarlarında, çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 118 *Prevotella* izolatı çalışılmıştır. İzolatlar, MALDI-TOF MS sistemi ve 16S rRNA gen bölgesi dizi analiziyle tanımlanmıştır. Gradyent test yöntemi (E-test; bioMerieux, Fransa) ile ampisilin, ampisilin-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, sefoksitin, meropenem, imipenem, klindamisin, eritromisin, tetrasiklin, tigesiklin, moksifloksasin ve metronidazol antimikrobiyal ilaçların minimum inhibitör konsantrasyonu değerleri belirlenmiş ve "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing", "Clinical and Laboratory Standards Institute" ve "Food and Drug Administration" tarafından önerilen rehberlere göre değerlendirilmiştir. On üç farklı *Prevotella* türü tanımlanmış olup en sık tür *Prevotella bivia* ve *Prevotella nigrescens* türleri (n= 21) saptanmış, bunları *Prevotella buccae* (n= 19) izlemiştir. *Prevotella* izolatlarının tamamı piperasilin-tazobaktam, sefoksitin,

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Nurver Ülger Toprak, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Başbüyük Yerleşkesi, Maltepe, İstanbul, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 533 450 1489, **E-posta (E-mail):** nurverulger@yahoo.com

meropenem, imipenem ve tigesikline duyarlı bulunmuştur. Toplamda izolatların 2 (%1.7)'sinde metronidazole direnç, 1 (%0.8)'inde ise ampicilin-sulbaktama orta direnç saptanmıştır. İzolatların ampicilin, klindamisin, tetrasiklin ve moksifloksasine direnç oranları ise sırasıyla %57.6, %36.4, %18 ve %16.3 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, piperasilin-tazobaktam, sefoksitin ve tigesiklinin, *Prevotella* türlerinde yüksek in vitro aktiviteye sahip olup ampirik tedavide seçilebilecek uygun antimikrobiyal ilaçlar oldukları görülmüştür. İmipenem ve meropenem yüksek etkili bulunmalarına rağmen, karbapenemler tedavide potansiyel olarak dirençli diğer mikroorganizmaların eşlik ettiği ciddi seyirli polimikrobiyal enfeksiyonlarda tercih edilmelidir. Ampicilin-sulbaktam ve metronidazole direnç ise duyarlılık paternlerinin periyodik olarak izlenmesinin gerekliliğini vurgulamaktadır. Ampicilin, klindamisin, tetrasiklin ve moksifloksasine direnç oranlarının yüksek olması, bu antimikrobiyal ilaçların antimikrobiyal duyarlılık testi yapılmadan enfeksiyon tedavisinde kullanılmaması gerektiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Prevotella*; antimikrobiyal duyarlılık; gradiyent test; MALDI-TOF MS; 16S rRNA geni.

ABSTRACT

Prevotella species, being members of the human microbiota, are obligate anaerobic gram-negative bacteria. These organisms may cause opportunistic infections, including specific oral infections, local or systemic infections. A significant increase of resistance to some antimicrobials has been detected among *Prevotella* species. The frequency of resistance vary among isolates from different infection sources and between geographic locations. The knowledge about the antimicrobial susceptibility patterns of different *Prevotella* species is limited in Turkey. Providing the antimicrobial susceptibility data of these bacteria is very important for effective empirical treatment. In this study, we aimed to determine susceptibility data for 12 antimicrobial agents against *Prevotella* strains originating from human infections, collected in two centers in Turkey. A total of 118 *Prevotella* strains, isolated from different clinical samples in Marmara University Faculty of Medicine Medical Microbiology and Istanbul University Faculty of Dentistry Oral Microbiology Laboratories between January 2014-December 2017, were tested. Organisms were identified by using MALDI-TOF MS and by 16S rRNA gene sequencing. Minimal inhibitor concentrations of ampicillin, ampicillin-sulbactam, piperacillin-tazobactam, cefoxitin, meropenem, imipenem, clindamycin, tetracycline, tigecycline, moxifloxacin and metronidazole were determined using gradiyent test methodology (E-test; bioMerieux, France) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical and Laboratory Standards Institute and Food and Drug Administration guidelines were used for interpretation. Thirteen different *Prevotella* species were identified, *Prevotella bivia* and *Prevotella nigrescens* were the most prevalent species (n= 21) followed by *Prevotella buccae* (n= 19). All *Prevotella* strains were susceptible to piperacillin-tazobactam, cefoxitin, meropenem, imipenem and tigecycline. A total of 2 (1.7%) isolates were resistant to metronidazole and 1 (0.8%) isolate was intermediately resistant to ampicillin/sulbactam. The frequency of resistant isolates against ampicillin, clindamycin, tetracycline and moxifloxacin were 57.6%, 36.4%, 18% and 16.3%, respectively. In conclusion, piperacillin/tazobactam, cefoxitin, and tigecycline displayed high in vitro activity against *Prevotella* spp. and they all remained good candidates for empiric therapy. Imipenem and meropenem were also found to be very active, but the usage of carbapenems should be reserved for serious mixed infections, potentially accompanied by other resistant organisms. Intermediate resistance to ampicillin-sulbactam and the resistance against metronidazole emphasized the need of periodic monitoring of their susceptibility patterns. The high rates of non-susceptibility to ampicillin, clindamycin, tetracycline and moxifloxacin indicated that these antimicrobials should not be used for treatment of infections without prior antimicrobial susceptibility testing.

Keywords: *Prevotella*; antimicrobial susceptibility; gradient test; MALDI-TOF MS; 16S rRNA gene.

GİRİŞ

Normalde ağız, sindirim sistemi ve vajan mikrobiyotalarının önemli bir kısmını oluşturan *Prevotella* türleri, fırsatçı enfeksiyonlara yol açabilmektedir. *Prevotella*, gingivitis,

periodontitis gibi diş ve dişeti hastalıklarına, apse, genital bölge veya sistemik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Enfeksiyonların şiddeti *Prevotella* türlerine göre farklılık göstermekte olup ciddi seyirli enfeksiyonlara neden olabilmekte ve ölümlü sonuçlanabilmektedir¹.

Zorunlu anaerop gram-negatif bir basil olan *Prevotella* cinsi içerisinde şimdiye kadar tanımlanmış 50 tür bulunmaktadır (<http://www.bacterio.net/prevotella.html>). Ancak bu bakterileri geleneksel yöntemlerle tür düzeyinde tanımlamak pek mümkün olamamaktadır. Günümüzde "matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight, mass spectrophotometry (MALDI-TOF MS)" gibi otomatize tanımlama sistemlerinin kullanılması, bakterilerin 16S rRNA bölgesinin dizi analiziyle *Prevotella* türleri hızlı ve doğru biçimde tanımlanabilmektedir².

Üretilmeleri yoğun emek, özel koşul ve laboratuvar düzenekleri gerektiren anaerop bakterilerin kültürü ve antimikrobiyal ilaçlara duyarlılıkları gerek dünyada gerekse ülkemizde çok az merkezde yapılmaktadır. Anaerop enfeksiyon şüphesi durumunda genellikle ampirik tedavi uygulanmaktadır. Ancak anaerop bakterilerde antimikrobiyal ilaçlara artan oranda direnç gelişmesi nedeniyle, ampirik tedavide yetersizlikler görülebilmektedir. Direnç oranının antimikrobiyal ilaçların çeşidine ve bakterilerin türüne göre farklılık gösterdiği bilinmektedir. Bu bağlamda tedavinin başarılı olabilmesi için, etken mikroorganizmanın doğru tanımlanması ve antimikrobiyal direnç profilinin belirlenmesi gerekmektedir³.

Anaerop bakterilerin duyarlılıklarını belirlemede "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" tarafından önerilen agar dilüsyon yöntemi, zahmetli olması ve uygulamanın pratik olmaması nedeniyle rutin laboratuvarda kullanılmamaktadır⁴. Bu yöntemin belirli zaman dilimlerinde yapılarak, antimikrobiyal ilaçlara direnç gelişiminin izlendiği sürveyans çalışmalarında kullanılmasının daha uygun olduğu kabul edilmiştir. Enfeksiyon etkeni anaerop bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanmasında, agar dilüsyon yöntemine alternatif olarak "Food and Drug Administration (FDA)" tarafından da kabul edilen gradyent test yöntemi kullanılabilir⁵.

Bu çalışmada, çeşitli hasta örneklerinden üretilen patojen *Prevotella* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması, bu izolatların anaerop bakterilere karşı etkinliğe sahip antimikrobiyal ilaçlara olan duyarlılık durumlarının gradyent test yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 01.09.2013 ve Karar no: 09.2013.0248).

Bakteri İzolatları

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine başvuran hastalardan Ocak 2014-Aralık 2017 tarihleri arasında

izole edilen *Prevotella* türleri çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan klinik örnekler, Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Kliniğinden (n= 19, %16.1), Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi genel cerrahi (n= 25, %21.2), enfeksiyon hastalıkları (n= 12, %10.2), kulak burun boğaz (n= 11, %9.3), acil servis (n= 10, %8.5), iç hastalıkları (n= 9, %7.6) ve diğer kliniklerden gönderilmiştir. Apse (n= 26, %22), batın içi apsesi (n= 29, %24), doku biyopsisi (n= 20, %16.9), periodontal cep/subgingival biyofilm örneği (n= 19, %16.1), kan (n= 7) ve beyin omurilik sıvısı (n= 1), plevra (n= 8) ve periton (n= 4) sıvısı gibi steril vücut sıvılarından üretilen ve tekrar etmeyen 118 *Prevotella* izolatu çalışmaya dahil edildi. Gaz karışımı; %85 azot, %10 karbondioksit ve %5 hidrojen olacak şekilde anaerob ortam sağlayıcı olarak anaerob kavanoz (GENbox, bioMerieux, Fransa), anaerob poşet (GENbag Anaerobic, bioMerieux, Fransa) ve anaerob kabin (Bactron-I, Shell Lab, ABD) kullanıldı. Önceden -80°C'de saklanmış izolatlar, duyarlılık testi öncesinde koyun kanı, K vitamini (1 µg/ml) ve hemin (5 µg/ml) ile zenginleştirilmiş *Brucella* agara ekilerek anaerob koşullarda üretildi.

Bakterilerin Tanımlanması

Tanımlama amacıyla kullanılan kanamisin (1000 µg), kolistin (10 µg) ve vankomisin (5 µg) disklerine dirençli, safraya duyarlı, hareketsiz, katalaz aktivitesi bulunmayan zorunlu anaerob gram-negatif basiller *Prevotella* olarak değerlendirildi⁶.

İzolatların tür düzeyinde tanımlanması Vitek MS (bioMerieux, Fransa) ile ve 16S rRNA gen bölgesine yönelik dizi analizi yapılarak gerçekleştirildi^{7,8}.

MALDI-TOF MS ile Tanımlama

Bakteri kültüründen birer koloni MALDI-TOF MS plağı üzerine yayıldıktan sonra üzerine 1 µl matriks çözeltisi (2,5-dihidroksibenzoik asit ve α-siyano-4-hidroksisinnamik asit) damlatılarak kurumaya bırakıldı. Daha sonra metal plak cihaz içine yerleştirilerek lazer atışlarına maruz bırakıldı. Elde edilen kütle spektrumları sistemin V3.0 bilgi veri tabanındaki spektrumlarla karşılaştırılarak bakteri tanımlandı. Sistemin kalibrasyonu ve bakterilerin tanımlama kontrolü için ATCC *Escherichia coli* 8739 suşu kullanıldı.

16S rRNA Geni Dizi Analizi ile Tanımlama

Quick-gDNA™ MiniPrep kiti (Zymo Research, ABD) kullanılarak elde edilen bakteri DNA'sından polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile, evrensel primerler; 8UA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 907B (5'-CCG TCA ATT CMT TTA GTT T-3') kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi amplifiye edildi⁹. Dizi analizi yapılan ampikonlar (Triogene, İstanbul) NCBI-Blast ile incelendi.

Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

İzolatların antimikrobiyal ilaçlara duyarlılıkları anaerob bakterilere uyarlanmış gradiyent test (E-test; bioMerieux, Fransa) yöntemi ile belirlendi⁵. Antimikrobialerin seçimi CLSI ve "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" önerileri dikkate alınarak yapıldı^{4,10}. Ampisilin, ampisilin-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam,

sefoksitin, meropenem, imipenem, tetrasiklin, tigesiklin, eritromisin, klindamisin, mok-sifloksasin ve metronidazol antimikrobiyal ilaçları ile çalışıldı. *Brucella* ağarda 48-72 saat inkübasyonu sonrası elde edilen taze kültüründen, *Brucella* sıvı besiyeri içinde McFarland 1 bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan K vitamini, hemin ve koyun kanı (%5) ile zenginleştirilmiş *Brucella* agara eküvyonla tüm plak yüzeyini kap-layacak şekilde inokülasyon yapıldı. Antimikrobiyal gradiyent test şeritleri plaklara uyg-landıktan sonra anaerob ortamda, 37°C'de 48 saat inkübe edilmiş ardından üremenin olmadığı en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak kabul edildi. Kontrol olarak *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 izolatı kullanıldı.

Tüm izolatların antimikrobiyal ilaçlara duyarlılık durumları hem CLSI hem de EUCAST dokümanlarına göre değerlendirildi^{4,10}. Test sonuçları öncelikle EUCAST önerilerine göre değerlendirildi, bu rehberde yer almayan antimikrobiyal duyarlılık sonuçları ise CLSI önerilerine göre değerlendirildi. Her iki dokümanda da sınır değerleri verilmeyen eritromisin için MİK aralığı ve MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri hesaplandı. Tigesiklin için ise FDA tarafından önerilen sınır değerleri (duyarlı= ≤ 2 mg/L, dirençli= ≥ 8 mg/L) temel alındı.

BULGULAR

Çalışmamızda Vitek MS (bioMerieux, Fransa) ile 12 farklı *Prevotella* türü %99.9 kesinlikte tanımlanmıştır. İzolatlar içinde iki tür; *Prevotella bivia* (n= 21, %17.8) ve *Prevotella nigrescens* (n= 21, %17.8) en fazla sayıda bulunmuş, bunu sırasıyla *Prevotella buccae* (n= 19, %16.1), *Prevotella denticola* n= 14, %11.9), *Prevotella intermedia* (n= 13, %11), *Prevotella melaninogenica* (n= 11, %9.3), *Prevotella oris* (n= 6, %5.1), *Prevotella disiens* (n= 5, %4.2), *Prevotella baroniae* (n= 4, %3.4) ve birer izolat ile *Prevotella buccalis*, *Prevotella oralis* ve *Prevotella veroralis* izlemiştir. Bir izolatın ise türü tanımlanamamıştır.

MALDI-TOF MS ile tanımlanamayan bir izolat 16S rRNA gen dizilemesi ile %99 oranıyla *Prevotella histicola* (GenBank erişim No: NR_113105.1) izolatı ile benzer bulunmuştur. Diğer izolatlar ise hem MALDI-TOF MS ile hem de 16S rRNA gen dizi analizi ile aynı tanıyı almıştır. Tanımlanan izolatların izole edildikleri klinik örnek tipine göre dağılımı Tablo I'de verilmiştir.

İzolatların tamamı piperasilin-tazobaktam, sefoksitin, imipenem, meropenem, ve tigesikline duyarlı bulunmuştur. Bir izolat ampisilin-sulbaktama orta düzeyde direnç, 2 izolat ise metronidazole direnç göstermiştir. Diğer antimikrobiyal ilaçlardan ampisilin, klindamisin, tetrasiklin ve moksifloksasine ise sırasıyla %57.6, %36.4, %18 ve %16.3 oranında direnç saptanmıştır. Çalışmaya alınan tüm antimikrobiyal ilaçlara duyarlı olanların oranı %16.1 iken, izolatların %83.9'u en az bir antimikrobiyale dirençli veya orta dirençli bulunmuştur. *Prevotella* türlerinin 12 antimikrobiyale duyarlılık profilleri, antimikrobiyal ilaçların MİK sınır değerleri, MİK₅₀ ve MİK₉₀ verileri Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo I. *Prevotella* Türlerinin İzole Edildikleri Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

Örnekler									Toplam
Türler	Apse	BİA	Doku/ biyopsi	Kan	Plevra sıvısı	Periton sıvısı	BOS	Oral*	sayı (%)
<i>P.baroniae</i>			1	1	1		1		4 (3.4)
<i>P.bivia</i>	9	2	6	2	1				21 (17.8)
<i>P.buccae**</i>	4	11	2	2					19 (16.1)
<i>P.buccalis</i>	1								1 (0.8)
<i>P.denticola</i>	2	3	2	1	2	1		2	14 (12)
<i>P.disiens</i>	2		3						5 (4.2)
<i>P.histicola***</i>						1			1 (0.8)
<i>P.intermedia</i>	2	1	1	1	2	2		4	13 (11)
<i>P.melaninogenica**</i>	1	5	3		2				11 (9.3)
<i>P.nigrescens</i>	3	3	2					13	21 (17.8)
<i>P.oralis</i>		1							1 (0.8)
<i>P.oris</i>	2	3	1						6 (5)
<i>P.veroralis</i>			1						1 (0.8)
Toplam sayı (%)	26 (22)	29 (24.6)	22 (18.6)	7 (5.9)	8 (6.8)	4 (3.4)	1 (0.8)	19 (16.1)	118 (100)

BİA: Batın içi apse, BOS: Beyin omurilik sıvısı.
* Periodontal cep/subgingival biyofilm örneği.
** Doku biyopsi örneklerinden izole edilenlerden birisi kemik örneğinden elde edilmiştir.
*** *Prevotella histicola* VITEK MS V3.0 sistemin bilgi veritabanında bulunmamaktadır.

Ampisilin, klindamisin, tetrasiklin ve moksifloksasine direncin türlere göre dağılımı irdelendiğinde, türler arasında farklılıklar gözlenmiştir (Tablo III). Ampisiline en yüksek oranda direnç %82 oranı ile *P.denticola*'da izlenirken, tetrasiklin ve moksifloksasine en yüksek direnç sırasıyla, %62 ve %71 oranı ile *P.bivia* izolatlarında gözlenmiştir. *P.buccae* klindamisine %53 oranında en yüksek direnci gösterirken, bunu %48 ile *P.bivia* izlemiştir. Antimikrobiyal direncin yıllara göre değişimi incelendiğinde klindamisin dışındaki tüm antimikrobiyal ilaçlara karşı direncin 3 yıl öncesine göre artış gösterdiği saptanmıştır (Şekil 1).

TARTIŞMA

Bu çalışmada, 2014-2017 yıllarını kapsayan dört yıllık zaman diliminde Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine başvuran hastalardan izole edilen *Prevotella* izolatlarının antimikrobiyal ilaçlara duyarlılıkları araştırılmıştır. Duyarlılık testi olarak, FDA tarafından önerilen, anaerob bakteriyolojiye uyarlanmış, laboratuvarında uygulanması kolay, güvenilir sonuçlar veren gradiyent testi seçilmiştir⁵. Çalışmamızın sonucunda 13 farklı *Prevotella* türü tanımlanmış izolatlarda farklı antimikrobiyal duyarlılık profilinin sergilendiği görülmüştür. Antimikrobiyal ilaçlara direnç profili irdelendiğinde izolatların ampisilin, klindamisin, tetrasiklin ve moksifloksasine yüksek oranda direnç gösterdikleri, hatta %11'inin üç veya daha fazla grup antimikrobiyal ilaca dirençli olduğu saptanmıştır.

Tablo II. *Prevotella* İzolatlarının Antimikrobiyal İlaçlara Duyarlılık Profilleri

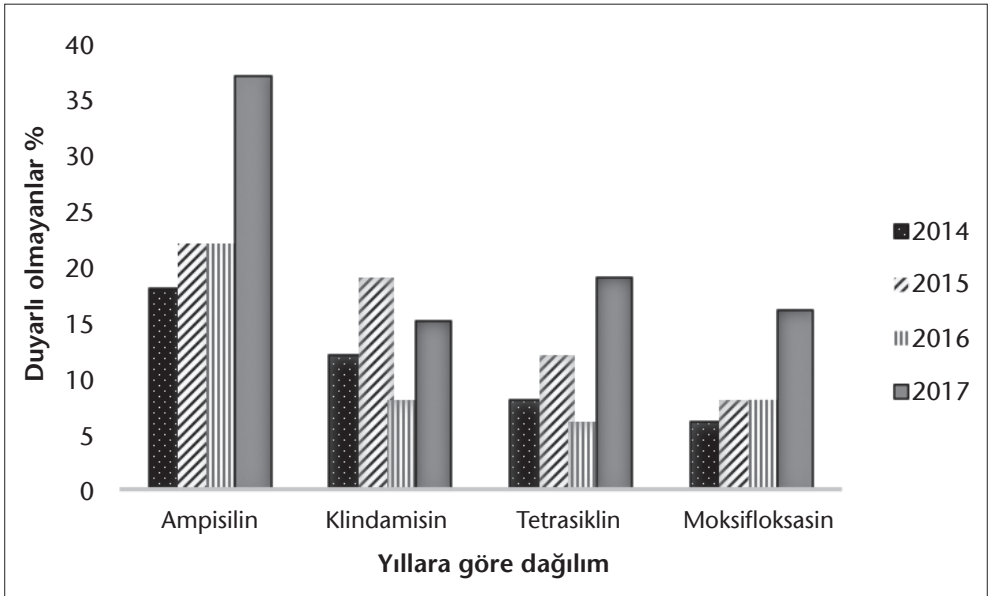
Antimikrobiyaller	Sınır değerleri (mg/L)				MİK değerleri (mg/L)				Duyarlılık profili (%)		
	Duyarlı	Orta dirençli	Dirençli	MİK aralıkları	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı olmayan*		
Ampisilin	≤ 0.5		> 2	< 0.016-> 256	12	> 258	36.4	57.6	59		
Ampisilin-sulbaktam	≤ 4		> 8	< 0.016-4	0.25	2	99.2	0	0.8		
Piperasilin-tazobaktam	≤ 8		> 16	< 0.016-4	< 0.016	0.064	100	0	0		
Sefoksitin	≤ 16	32	≥ 64	< 0.016-32	0.5	8	98.3	0	1.7		
İmpenem	≤ 2		> 8	< 0.002-1	0.032	0.125	100	0	0		
Meropenem	≤ 2		> 8	< 0.002-0.5	0.032	0.125	100	0	0		
Klindamisin	≤ 4		> 4	< 0.016-> 256	0.016	256	63.6	36.4	36.4		
Eritromisin*	YA		YA	< 0.016-> 256	2	> 256	-	-	-		
Tetrasiklin	≤ 4	8	≥ 16	< 0.016-> 256	0.5	32	71	18	29		
Tigesiklin	≤ 4	8	≥ 16	< 0.016-4	0.06	0.25	100	0	0		
Moksifloksasin	≤ 2	4	≥ 8	< 0.002-> 32	0.25	32	81.8	16.3	17.8		
Metronidazol	≤ 4		> 4	< 0.016-16	0.032	1	98.3	1.7	1.7		

* Duyarlı olmayan; dirençli ve orta dirençli MİK değerlerine sahip olanlar aynı gruba dahil edilmmiştir.
YA: EUCAST ve CLSI rehberlerinde eritromisine ait sınır MİK değerleri yer almamaktadır.
MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

Tablo III. *Prevotella* Türlerinin İzole Edildikleri Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

	Ampisilin	Tetrasiklin	Klindamisin	Moksifloksasin
<i>P.bivia</i>	48	62	48	71
<i>P.buccae</i>	47	33	53	0
<i>P.denticola</i>	82	18	45	18
<i>P.intermedia</i>	44	11	22	22
<i>P.melaninogenica</i>	55	27	27	45
<i>P.nigrescens</i>	50	0	13	13
<i>Prevotella</i> spp.*	75	40	30	15

Sayısı 10'dan az olan *Prevotella* türleri *Prevotella* spp. adı altında toplanmıştır.



Şekil 1. *Prevotella* türlerinin dört antimikrobiyale yıllar içinde gösterdiği direnç oranları.

Dünya ve ülkemiz literatüründe *Prevotella* izolatları ile yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar belirli merkezlerde az sayıda *Prevotella* izolatının da dahil edildiği, o merkeze ait anaerob bakteri duyarlılık çalışmalarıdır. *Prevotella* izolatları için sonuçların genellikle tür düzeyinde ayırım yapılmaksızın değerlendirildiği görülmektedir^{12,13}. Son yıllarda ülkemiz izolatlarının da dahil edildiği, Avrupa ülkelerini kapsayan patojen *Prevotella* izolatlarının ele alındığı çok merkezli "ESCMID Study Group for Anaerobic Infections (Avrupa Anaerob Çalışma Grubu) (ESGAI)" çalışmasında direnç oranlarının, türlere göre ve tüketilen antimikrobiyal ilaç miktarına bağlı olarak ülkelere göre farklılık gösterdiği saptanmıştır¹⁴. On üç ülkeden, 19 *Prevotella* türünden oluşan 508 izolatın yer aldığı bu çalışmada ampisilin (%51.2), klindamisin (%33.7), tetrasiklin (%36.8)

ve moksifloksasine (%18.3) yüksek oranda direnç bulunmuştur¹⁴. Çalışma sonuçlarımız kıyaslandığında bizim izolatlarımızda ampisiline duyarlı olmayanların oranı (%59) daha yüksek bulunmuştur. Penisiline direnç ise çeşitli çalışmalarda farklı oranlardadır; %90'lara varan oranda direnç varlığından söz eden çalışmalar da olmuştur¹⁵⁻¹⁷. Penisilin direncinin önemli bir kısmı, beta-laktamaz aktivitesine bağlanmıştır¹³. Beta-laktamaz aktivitesini saptamak için laboratuvarlarda kullanılan nitrosetin testi ile pigmentli *Prevotella* izolatlarımızın aktivitesi değerlendirilemediği için çalışılmamıştır. Ancak, ampisiline dirençli izolatlarımızın piperasilin-tazobaktam ve ampisilin-sulbaktama duyarlı (orta dirençli bir izolat hariç) bulunması nedeniyle izolatlarımızdaki ampisilin direncinden beta-laktamaz aktivitesinin sorumlu olduğunu söyleyebiliriz. Ampisilin-sulbaktama orta dirençli bir izolatın ise penisilin bağlayan proteinler veya porinlerle ilgili mekanizmalara bağlı olabileceği varsayılabilir. Benzer şekilde Bahar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada¹⁸, *Prevotella* türleri arasında farklılıklar olmakla birlikte penisiline %18 ile %68.4 arasında değişen oranlarda direnç saptanmış ve bu izolatların tamamı, ampisilin-sulbaktama duyarlı bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, beta-laktamaz inhibitörlü beta-laktam antimikrobiyal ilaçlarının ampirik tedavide güvenle kullanılabileceğini öngörebiliriz.

Ülkemizde *Prevotella* türlerinin antimikrobiyal ilaçlara duyarlılıklarını araştıran çalışmalar son derece az olup bunlardan en kapsamlısı Bahar ve arkadaşları¹⁸ tarafından 2005 yılında yayımlanmıştır. Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilmiş farklı beş türden oluşan 72 *Prevotella* izolatının benzilpenisilin, ampisilin-sulbaktam, sefoksitin, imipenem, klindamisin ve metronidazole duyarlılıkları gradiyent testiyle (E- test; AB Biodisc, Solna, İsveç) araştırılmıştır. İzolatların tamamı yukarıda belirtildiği gibi ampisilin-sulbaktama, yanı sıra sefoksitin, imipenem ve metronidazole duyarlı bulunmuştur. Klindamisine %5.5 oranında direnç saptanmıştır. Çalışmamızda izolatlarımız arasında genel olarak klindamisine direnç daha yüksek (%36.4) bulunmuştur. Farklı ülkelerde klindamisine artan oranda direnç geliştiği, direnç oranının %33'lere ulaştığı bildirilmiştir. Klindamisine direnç düzeyi, çalışmanın yapıldığı zaman dilimine, ülkelere, organizmaların izole edildiği materyale ve çalışma popülasyonuna göre farklılık göstermektedir^{12,14,19,20}.

Dünya genelinde *Prevotella* izolatlarının tetrasiklin duyarlılık profili ile ilgili veriler çok az olmakla birlikte, tüketilen antimikrobiyal ilaç miktarı ile direnç varlığı arasında bağlantı ortaya koyan çalışmalar bildirilmiştir. Belçika ve Bulgaristan'da tetrasiklin kullanımının sınırlandırılmasıyla yaklaşık 10 yıl içinde direnç oranında iki misli azalma gerçekleşmiştir^{12,20}. Çalışmamızda tetrasikline direnç, türler arasında belirgin farklılık göstermektedir; *P.nigrescens* izolatlarının hiçbirinde direnç gözlenmezken, *P.bivia* izolatlarında en fazla %62 oranında direnç saptanmıştır. Genel olarak, tüm izolatlarımız ele alındığında tetrasikline direnç oranımız %29 oranı ile ESGAI'nın %36.8 oranında izlenen verilerine göre daha düşük bulunmuştur¹⁴.

Avrupa anaerob çalışma grubunun verilerine göre daha düşük etkili bulunan diğer bir antimikrobiyal ilaç ise moksifloksasindir¹⁴. Moksifloksasin, erişkinlerde gelişen diğer anaeroplara da kapsayan çeşitli enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla kullanılan geniş

spektrumlu bir antimikrobiyaldir. İlk kullanıma başlandığında izolatların tamamı duyarlıyken zaman içinde yüksek oranlarda direnç gelişmiştir²¹. En yüksek direnç oranı %42 ile Yunanistan'dan bildirilmiş ve türler içinde *P.bivia* %71 oranında en yüksek dirence sahip bulunmuştur²².

Sonuçlarımıza göre, *Prevotella* türlerine bağlı enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilen en etkili antimikrobiyal ilaçların imipenem, meropenem, piperasilin-tazobaktam ve tigesiklin olduğu görülmektedir. Ancak karbapenemler, diğer dirençli organizmaların eşlik ettiği ciddi seyirli, polimikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde tercih edilmelidir. Çok az oranda tespit edilmekle birlikte, ampisilin-sulbaktam ve metronidazole karşı bulunan direnç, izolatlarımızın duyarlılık paternlerinin periyodik olarak dikkatle izlenmesinin gerekliliğini vurgulamaktadır. Ampisilin, klindamisin, tetrasiklin ve moksifloksasine direnç oranlarının yüksek olması, bu antimikrobiyal ilaçları, duyarlılık testi yapılmadan enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaması gerektiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, izolatlarımızda antimikrobiyal ilaçlara direnç oranı bilinenden daha fazladır ve giderek artış göstermekte olup türler arasında farklı seyretilmektedir. Başarılı bir tedavi için mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanmaları ve antimikrobiyal ilaçlara duyarlılık profilinin belirlenmesi önemlidir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Könönen E, Wade WG, Citron DM. *Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium, and other anaerobic gram-negative rods*, pp: 858-80. In: Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2011, 10th ed. Vol 2. ASM Press, Washington, DC.
2. Yunoki T, Matsumura Y, Nakano S, Kato K, Hotta G, Noguchi T, et al. Genetic, phenotypic and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry-based identification of anaerobic bacteria and determination of their antimicrobial susceptibility at a university hospital in Japan. *J Infect Chemother* 2016; 22(5): 303-7.
3. Boyanova L, Kolarov R, Mitov I. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. *Anaerobe* 2015; 31: 4-10.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria*. Approved standard, 8th ed. CLSI document, 2012, M11-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
5. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29(10): 2197-203.
6. Jusimies-Somer H, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth KTL Anaerobic Bacteriology Manual*. 2002, 6th ed. Star Publishing, Belmont, CA.
7. Ferrand J, Bonnet I, Alauzet C, Lozniewski A. Evaluation of the Vitek MS and the MALDI Biotyper systems for the identification of less commonly isolated but clinically relevant anaerobes and facultative anaerobes. *Anaerobe* 2018; 54: 210-6.
8. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(10): 908-34.

9. 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.
10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.euc.ast.org>.
11. Tygacil®, 2010 Federal Drug Administration, Product Information. Pfizer Inc., Collegeville, PA, USA.
12. Boyanova L, Kolarov R, Gergova G, Dimitrova L, Mitov I. Trends in antibiotic resistance in *Prevotella* species from patients of the university hospital of maxillofacial surgery, Sofia, Bulgaria, in 2003-2009. Anaerobe 2010; 16(5): 489-92.
13. Brook I, Wexler HM, Goldstein EJ. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2013; 26(3): 526-46.
14. Ulger Toprak N, Veloo ACM, Urban E, Wybo I, Justesen US, Jean-Pierre H, et al. A multicenter survey of antimicrobial susceptibility of *Prevotella* species as determined by Etest methodology. Anaerobe 2018; 52: 9-15.
15. Liu CY, Huang YT, Liao CH, Yen LC, Lin HY, Hsueh PR. Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(9): 3161-8.
16. Jamal W, Al Hashem G, Rotimi VO. Antimicrobial resistance among anaerobes isolated from clinical specimens in Kuwait hospitals: comparative analysis of 11-year data. Anaerobe 2015; 31: 25-30.
17. Jeverica S, Kolenc U, Mueller-Premru M, Papst L. Evaluation of the routine antimicrobial susceptibility testing results of clinically significant anaerobic bacteria in a Slovenian tertiary-care hospital in 2015. Anaerobe 2017; 47: 64-9.
18. Bahar H, Torun MM, Demirci M, Kocazeybek B. Antimicrobial resistance and beta-lactamase production of clinical isolates of *Prevotella* and *Porphyromonas* species. Chemotherapy 2005; 51(1): 9-14.
19. Glupczynski Y, Berhin C, Nizet H. Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in Belgium as determined by E-test methodology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28(3): 261-7.
20. 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.
21. Goldstein EJ, Citron DM, Warren YA, Tyrrell KL, Merriam CV, Fernandez H. In vitro activity of moxifloxacin against 923 anaerobes isolated from human intra-abdominal infections. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(1): 148-55.
22. Papaparaskevas J, Pantazatou A, Katsandri A, Houhoula DP, Legakis NJ, Tsakris A, et al. Moxifloxacin resistance is prevalent among *Bacteroides* and *Prevotella* species in Greece. J Antimicrob Chemother 2008; 62(1): 137-41.