

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZLARIN SAPTANMASINDA FENOTİPİK YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

THE COMPARISON OF PHENOTYPIC METHODS FOR DETERMINATION OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASES

Ayşe Nur YURTMAN, Mine HOŞGÖR-LİMONCU, Şafak ERMERTCAN, Bayrı ERAÇ

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Anahtar Sözcükler: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, E-test, çift disk sinerji testi

Keywords: Extended spectrum beta-lactamase, E-test, double disk synergy test

Geliş: 26 Aralık 2008

Kabul: 29 Ocak 2009

ÖZET

Bu çalışmada, *Enterobacteriaceae* üyelerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretiminin saptanmasında çift disk sinerji testi ile E-test yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 71 *Escherichia coli*, 14 *Klebsiella pneumoniae*, 15 *Klebsiella* spp. ve bir *Klebsiella oxytoca* olmak üzere toplam 101 *Enterobacteriaceae* kökeni çalışmaya alınmıştır. Çift disk sinerji (ÇDS) yöntemiyle kökenlerin %86'sı (87 köken) GSBL olumlu iken E-test yöntemine göre %81'i (82 köken) GSBL pozitif bulunmuştur. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ÇDS ve E-test yöntemleri arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır.

SUMMARY

The purpose of this study was to compare the double disk synergy and E-test methods for detection of ESBL production in *Enterobacteriaceae* members. Totally 101 *Enterobacteriaceae* isolates including 71 *Escherichia coli*, 14 *Klebsiella pneumoniae*, 15 *Klebsiella* spp., and one *Klebsiella oxytoca* were included in the study. By double disk synergy method 86% of isolates were GSBL positive (87 isolates) and 81% (82 isolates) were positive by E-test method. The results were statistically evaluated and no significant difference was found between E-test and double disk synergy method.

GİRİŞ

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi, özellikle Gram-negatif bakterilerde beta-laktamlara karşı gelişen en önemli direnç mekanizmalarından biridir (1). Çoğunlukla plazmitlerce kodlanan GSBL enzimleri sefotaksim, seftriakson, seftazidim gibi oksimino sefalosporinler ile aztreonam gibi monobaktamlara karşı direnç gelişimine neden olmaktadır. Bu enzimler başta *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli* olmak üzere *Citrobacter*, *Serratia* ve *Salmonella* gibi diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde ve bazı non-fermentatif bakterilerde de bulunabilmektedir (2). TEM-3 ve SHV-2 gibi bazı GSBL enzimleri sefalosporinlere karşı yüksek düzey direnç kazandırırken, TEM-7 ve TEM-12 gibileri

çok düşük düzeylerde direnç oluşturdıkları için rutin mikrobiyolojik testlerle saptanamayabilirler (3). Bu nedenle Gram-negatif bakterilerin GSBL üretiminin saptanmasında sorunlarla karşılaşmaktadır. Bunun yanında bakterilerde farklı direnç mekanizmalarının bulunması (porin değişikliği, efluks pompası varlığı gibi) GSBL saptanmasını daha da zorlaştırmaktadır. GSBL enzimi üreten bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde penisilin ve sefalosporinler kullanılmamalıdır. Bu nedenle etken mikro-organizmaların GSBL üretimi yönünden araştırılması tedavi açısından önem taşımaktadır (4).

Bu çalışmada, *Enterobacteriaceae* üyelerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin saptanmasında

Tablo 1. E-test ve ÇDS yöntemlerine göre kökenlerin GSBL pozitifliği

Kökenler (No)	E-test		ÇDS	
	GSBL (+)	GSBL (-)	GSBL (+)	GSBL (-)
<i>Escherichia coli</i> (71)	57	14	63	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (14) ppp(((14) <i>pneumoniae</i>	12	2	11	3
<i>Klebsiella</i> spp.(15)	12	3	13	2
<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	1	0	0	1
Toplam (101)	82	19	87	14

ÇDS: Çift disk sinerji, GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz

çift disk sinerji testi ile E-test yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 71 *Escherichia coli*, 14 *Klebsiella pneumoniae*, 15 *Klebsiella* spp., ve bir *Klebsiella oxytoca* olmak üzere toplam 101 *Enterobacteriaceae* kökeni çalışmaya alındı. Çalışmada GSBL negatif kontrol kökeni olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı. Pozitif kontrol olarak daha önce polimeraz zincir reaksiyonu testi ile *bla*_{CTX-M} pozitif bulunan birer *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökeni kullanıldı.

Kökenler çalışma başlayınca kadar % 10 oranında gliserin içeren buyyon besiyerinde -70° C'de saklandı. Kökenler çalışmadan bir gün önce Eozin Metilen Blue (EMB) agara pasajlanarak canlandırıldı.

E-test: GSBL saptamaya yönelik üretilmiş olan E-test şeritlerinin bir tarafında belirli konsantrasyonlarda (0.5-32 µg/mL) seftazidim, diğer tarafında ise seftazidim/klavulonik asit (0.064-4 µg/mL) bulunmaktadır. Üretici firmanın (AB Biodisk, Sonla, İsveç) önerileri doğrultusunda bakterilerin bir gecelik taze kültürlerinden hazırlanan 0.5 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonları Mueller-Hinton agar besiyerine ekildi. E-test şeritleri besiyeri üzerine yerleştirildi. Kökenler 35° C'de 18–20 saat inkübe edildikten sonra sonuçlar değerlendirildi. Seftazidim MİK değerinin, seftazidim-klavulonik asit MİK değerinden en az sekiz kat fazla olması GSBL pozitifliği olarak kabul edildi (5).

Çift disk sinerji testi: Bu test için 0.5 McFarland standardında hazırlanan bakteri süspansiyonları Mueller-Hinton agar besiyerine ekildi. Merkeze amoksisilin-klavulonik asit (10+20 µg) diski yerleştirilerek, çevresine merkezden merkeze uzaklığı 25 mm olacak şekilde aztreonam (30 µg), seftazidim (30 µg) ve sefotaksim (30 µg) diskleri yerleştirildi, 35° C'de 18–20 saat inkübe edildikten sonra sonuçlar değerlendirildi. Antibiyotiklere

ait inhibisyon zonlarının klavulonik asit diskine doğru genişlemesi veya iki inhibisyon zonu arasındaki bakteriy üreyen alanda üremenin olmadığı bir bölgenin görülmesi GSBL olumluluğu olarak değerlendirildi (6).

İstatistik değerlendirme: ÇDS ve E-test yöntemlerinin karşılaştırılması Mc Nemar kıkare testine göre yapıldı.

BULGULAR

Escherichia coli ve *Klebsiella* kökenlerinde E-test yöntemi ile sırasıyla %80 ile %83 oranlarında, ÇDS testi ile sırasıyla %89 ve %80 oranlarında GSBL pozitifliği saptandı. Çalışmaya alınan kökenlere ait tüm sonuçlar Tablo 1'de görülmektedir. *Escherichia coli* kökenlerinde ÇDS yöntemiyle, *Klebsiella* kökenlerinde ise E-test yöntemiyle daha fazla oranda GSBL pozitifliği saptanmıştır.

İstatiksel değerlendirme: Sonuçlar Mc Nemar kıkare testi ile değerlendirildi, E-test ve ÇDS arasında GSBL saptamada anlamlı bir fark saptanmadı.

TARTIŞMA

Penisilin, sefalosporin, monobaktam ve karbapenemler gibi beta-laktam antibiyotikler dünyada en yaygın kullanıma sahip antibakteriyel ilaç grubunu oluştururlar. Ancak günümüzde bu antibiyotiklere karşı Gram-negatif bakterilerde artan bir direnç söz konusudur. Bu direncin en önemli nedeni bu antibiyotikler üzerinde hidrolitik aktiviteye sahip GSBL enzimleridir (2, 7). Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimlerinin son yıllardaki hızlı artışı bu enzimleri taşıyan bakteriler tarafından oluşan infeksiyonların tedavisinde güçlükler neden olmaktadır. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz saptanmasında en çok kullanılan fenotipik yöntemler arasında E-test, ÇDS testi, üç boyutlu test, dilüsyon yöntemleri ve otomatize sistemler (VİTEK) bulunmaktadır (4). Çalışmamızda E-test ve ÇDS testleri kullanılarak bu yöntemlerin GSBL saptamada birbirinden farkları araştırılmıştır. Bu amaçla 101 *Enterobacteriaceae* kökeni kullanılmıştır.

Kökenlerin %86'sı (87 köken) ÇDS testi ile %81'i (82 köken) E-test ile GSBL olumlu bulunmuştur. *Escherichia coli* kökenlerinde GSBL pozitifliği E-test ve ÇDS yöntemleri ile sırasıyla %80 ve %89 olarak saptanmıştır ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır. *Klebsiella* kökenlerinde ise E-test ve ÇDS yöntemleri ile GSBL pozitiflik oranları sırasıyla %83 ve %80 olarak bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Bu konuda ülkemizde ve dünyada da yapılmış pek çok çalışma vardır. Ülkemizdeki çalışmalarda; Abacıoğlu ve ark. (8) 24 *K. pneumoniae* kökeninde GSBL varlığını E-test ve ÇDS yöntemlerini kullanarak araştırmış ve ÇDS yöntemiyle kökenlerin %60'ında, E-test yöntemiyle %50'sinde GSBL varlığı saptamışlardır ve ÇDS yönteminin E-test yöntemine göre daha ucuz, duyarlı ve uygulanabilir olduğu sonucuna varmışlardır. Aktaş ve ark. (9) Gram-negatif bakterilerde GSBL varlığını E-test ve ÇDS yöntemleriyle karşılaştırmışlar, iki yöntem arasında GSBL saptamada anlamlı bir fark olmadığını belirtmişlerdir. ÇDS yönteminin daha ucuz olması nedeniyle rutin laboratuvar uygulamaları için daha uygun olduğu sonucuna varmışlardır. Akçam ve ark. (5) hastane enfeksiyonu etkeni Gram-negatif bakteriler üzerinde E-test ve ÇDS yöntemlerini karşılaştırmışlar ve sırasıyla kökenlerin %14,8 ve %16,3'ünde GSBL varlığı saptamışlar ve iki yöntem arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemişlerdir. Bu çalışmalar ve bizim sonuçlarımız birlikte değerlendirildiğinde, her iki test arasında GSBL saptanması açısından anlamlı bir fark görülmemektedir.

Yurt dışında yapılan benzer çalışmalardan birinde Vercauteren ve ark. (2) GSBL ürettiği bilinen 33 kökende GSBL varlığını ÇDS testi ile %96,9 ve E-test ile %81 oranında saptamışlar, her iki yöntemin de duyarlılığının benzer olduğunu vurgulamışlardır. Tseng ve ark.(10) GSBL saptamada agar dilüsyon, E-test ve ÇDS yöntemlerini bir arada kullanmışlar ve yöntemlerin güvenilirliğini benzer bulmuşlardır.

E-test yönteminin ÇDS yöntemine göre daha güvenilir olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur. Palasubramaniam ve ark.(11) seftazidim dirençli *K. pneumoniae* kökenlerinde GSBL varlığını çift disk sinerji, inhibitör etkili disk difüzyon ve E-test yöntemleri kullanarak araştırmışlar ve E-test yönteminin GSBL saptanmasında en etkin yöntem olduğu sonucuna varmışlardır. Ülkemizde Zarakolu ve ark.(12) GSBL varlığını farklı fenotipik yöntemler kullanarak değerlendirmişler ve E-test yönteminin ÇDS yöntemi ve kombine disk sinerji testlerine göre daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır.

Çalışmamızda elde edilen sonuçların, dünyada ve Türkiye'de günümüze kadar yapılan birçok çalışma ile örtüştüğü görülmektedir. ÇDS testi ve E-test arasında GSBL saptamada anlamlı bir fark olmadığı ancak ÇDS testinin E-test'e göre daha ucuz ve uygulanabilir olması nedeniyle ÇDS testinin rutin laboratuvarlar için daha uygun bir yöntem olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1880-4.
2. Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, Sanders CC, Goossens H. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian Teaching Hospital. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2191-7.
3. Azavedo PA, Gonçalves ALS, Musskopf MI, Ramos CG, Dias CA. Laboratory tests in the detection of extended spectrum beta-lactamase production: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) screening test, the e-test, the double disk confirmatory test, and cefoxitin susceptibility testing. *Brazil J Infect Dis* 2004; 8: 372-7.
4. Kaçmaz B, Çakır FÖ, Aksoy A. Hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz saptanması. *ANKEM Derg* 2005; 19: 125-9.
5. Akçam FZ, Gönen İ, Kaya O, Yaylı G. Hastane etkeni çeşitli gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapımının iki yöntemle araştırılması. *KLİMİK Derg* 2004; 17: 47- 9.
6. Hoşgör M, Özkan F, Yapar N, Tünger A, Özinel MA. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların belirlenmesinde çift diskli sinerji testi ile üç boyutlu yöntemin karşılaştırılması. *KLİMİK Derg* 1998; 11: 59-60.
7. Pitout JDD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 52-9.
8. Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ N. "Extended spectrum beta-lactamase" saptanmasında E testi ile çift disk sinerji yöntemlerinin karşılaştırılması. *İnfeks Derg* 1995; 9: 93-5.
9. Aktaş AE, Altoprak Şahin Ü, Yiğit N, Doğruman AI F, Tuncel E. Gram -negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların çift disk sinerji ve e-test yöntemleriyle araştırılması. *İnfek Derg* 2001; 15: 325-8.
10. Tseng CY, Liu PY, Wu WL, Lau YJ, Hu BS, Shi ZY, Lin YH. Comparison of detection of extended-spectrum beta-lactamases by agar dilution method, e-test esbl screen and double disk test. *J Microbiol Immunol Infect* 1998; 31: 90-4.

11. **Palasubramaniam S, Parasakthi N.** Comparison of three different methods for the presumptive detection of ESBL production in ceftazidime-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Malays J Pathol* **2001**; 23: 73-8.
12. **Zarakolu P, Metan G, Hasçelik G, Akova M.** Comparison of different phenotypic methods detecting extended spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Mikrobiyol Bul* **2005**; 39: 265-72.

İLETİŞİM

Doç. Dr. Mine HOŞGÖR LIMONCU
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
35100 Bornova, İZMİR
e-posta: mine.hosgor.limoncu@ege.edu.tr