

# Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Belirlenmesinde Çift Diskli Sinerji Testi ile Üç Boyutlu Yöntemin Karşılaştırılması

Mine Hoşgör<sup>1</sup>, Feriha Özkan<sup>2</sup>, Nur Yapar<sup>3</sup>, Alper Tünger<sup>2</sup>, M. Ali Özinel<sup>2</sup>

**Özet:** Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 51 *Escherichia coli* ve 46 *Klebsiella pneumoniae* kökeninde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların (extended spectrum beta-lactamases, ESBL) varlığı çift diskli sinerji ve üç boyutlu testle araştırıldı. Çift diskli sinerji testi ile ESBL olumluluğu *E. coli* ve *K.pneumoniae* kökenlerinde sırasıyla %18, %43 bulunurken, üç boyutlu testle %25 ile %46 oranında saptandı. İstatistiksel değerlendirmede her iki test arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

**Anahtar Sözcükler:** Gram-negatif çomaklar, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, çift diskli sinerji testi, üç boyutlu test.

**Summary:** Comparison of double-disk synergy and three dimensional tests in detection of extended spectrum beta-lactamases. Existence of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in 51 of *Escherichia coli* and 46 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from various clinical specimens was investigated by double-disk synergy and three dimensional tests. A comparison of these methods reveal that there is no statistically significant difference between them. It was determined by double-disk synergy test that *E.coli* and *K. pneumoniae* strains produce ESBL in ratios of 18% and 43%, respectively. In the case of three dimensional test, these ratios were found as 25% and 46%.

**Key Words:** Gram-negative rods, extended spectrum beta-lactamases, double-disk synergy test, three dimensional test.

## Giriş

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, sefotaksim, seftazidim, seftriakson gibi oksimin beta-laktamlara ve aztreonama direnç kazandıran ve genetik şifresi plazmid üzerinde taşınan enzimlerdir (1,2). İlk olarak 1983 yılında Avrupa'da *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde tanımlanan bu enzimler, daha sonra *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyelerinde de gösterilmiştir (3-6). Hibridizasyon deneyleri ile ESBL'lerin TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta-laktamaz genlerinde meydana gelen basit nokta mutasyonları sonucunda ortaya çıktığı saptanmıştır (2,7).

ESBL'ler, üçüncü kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize eder ve beta-laktam antibiyotiklerle tedaviyi güçleştirirler. ESBL'ler genellikle beta-laktamaz inhibitörleri ile hidrolize edilebilirler ve bu enzimler karbapenemlere (imipenem, meropenem), sefamisinlere (sefoksitin, moksalaktam) ve temosiline etkili değildir (3,4,8-10). ESBL üreten bakteriler rutin duyarlılık deneylerinde sefotaksim, seftriakson, seftazidim ve/veya aztreonama direnç görülmesi ile belirlenebilir. Ancak bazen ESBL oluşturan kökenlerle yapılan duyarlılık deneylerinde bu antibiyotiklere direnç saptanamaz ve bu durum da klinikte tedavi başarısızlıklarına yol açar (4,8,11) Şimdiye kadar ESBL varlığını belirlemede çeşitli yöntemler önerilmiştir. Bunlardan başlıcaları üç boyutlu test, çift diskli sinerji testi, dilüsyon yöntemleri, otomatize sistemler (Vitek) ve E testidir (11).

Bu çalışmada *Enterobacteriaceae* üyesi 97 kökende ESBL üretiminin çift diskli sinerji ve üç boyutlu test yöntemleri kullanılarak araştırılması ve sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

- (1) Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İzmir
- (2) Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İzmir
- (3) Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Bornova-İzmir

VIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (6-10 Ekim 1997, Antalya)'nde bildirilmiştir.

## Yöntemler

Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 51 *Escherichia coli* ve 46 *K.pneumoniae* kökeninde ESBL varlığı çift diskli sinerji testi ve üç boyutlu testle araştırıldı. Çalışmada beta-laktamaz negatif kontrol kökeni olarak *E.coli* ATCC 25922 kullanıldı.

Disk difüzyon ve üç boyutlu yöntemde kullanılacak bakteri inokülasyonları için daha önceden stoklanan kökenler canlandırıldı ve bir gece EMB agarında (Oxoid) inkübe edildi. Disk difüzyon yöntemi için Brain-Heart Infusion Broth (Oxoid)'da 108 cfu/ml, üç boyutlu yöntem için 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> cfu/ml bakteri süspansiyonu hazırlandı.

**Üç Boyutlu Yöntem:** Hazırlanan 10<sup>8</sup> cfu/ml bakteri süspansiyonundan Mueller-Hinton agarına (Oxoid) yüzeyel ekim yapıldı. Daha sonra Petri plağının ortasına yakın tarafta ve kullanılacak antibiyotik disklerinden 3 mm uzakta olacak şekilde besiyeri daire şeklinde kesildi. Ardından üç boyutlu yöntem için hazırlanan süspansiyondan (10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> cfu/ml) steril otomatik pipetle 200 µl alınarak, kesilen besiyeri çizgisi dolduruldu. Her iki inokülasyon yapıldıktan sonra seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg) ve aztreonam (30 µg) (Oxoid) diskleri yerleştirildi ve plaklar 35°C'de 18-20 saat inkübe edildi. Aztreonam, seftazidim ve sefotaksime ait inhibisyon zonlarının dairesel biçiminde bozulma, kesintiye uğraması veya kökenin inoküle edildiği kesi çizgisi yakınında birbirinden ayrı kolonilerin üremesi, antibiyotiğin yoğun inokülasyon bölgesinden geçerken inaktive edildiğini gösterdi ve ESBL olumluluğu olarak değerlendirildi (4).

**Çift Diskli Sinerji Testi:** Bu test, disk difüzyon yönteminin standartlarına uyularak Mueller-Hinton agarında (Oxoid) yapıldı. Merkezde amoksisilin-klavulanik asid (10+20 µg) diski yerleştirilerek, çevreye merkezden merkeze uzaklığı 25 mm olacak şekilde aztreonam (30 µg), seftazidim (30 µg) ve sefotaksim (30 µg) diskleri konuldu. Kökenler 35°C'de 18-20 saat inkübe edildikten sonra sonuçlar değerlendirildi. Antibiyotiklere ait inhibisyon zonlarının klavulanik asid diskinde doğru genişlemesi veya

**Tablo 1. İncelenen Bakterilerin Çift Diskli Sinerji Testi ve Üç Boyutlu Test ile Saptanan ESBL Üretim Oranları**

Kökenler	Çift Diskli Sinerji		Üç Boyutlu Test	
	n	(%)	n	(%)
<i>E.coli</i> (n=51)	9	(18)	13	(25)
<i>K.pneumoniae</i> (n=46)	20	(43)	21	(46)
Toplam (n=97)	29	(30)	34	(35)

iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri üreyen alanda üremenin olmadığı bir bölgenin görülmesi ESBL olumluluğu olarak yorumlandı.

### Sonuçlar

Her iki yöntem ile *K. pneumoniae* ve *E.coli* kökenlerinde saptanan ESBL üretim oranları Tablo 1'de gösterilmiştir. Her iki yöntemin birbiriyle uyumu tutarlılık analizi testi ile yapıldı (Tablo 2) ve istatistiksel olarak uyumlu bulundu.

### İrdeleme

Laboratuvarlarda yapılan rutin duyarlılık deneylerinde ESBL varlığını gözlemlemek zordur. Ancak sefotaksim, seftazidim, seftriksim ve/veya aztreonam alışımlı dışında direnç görülmesi ESBL üretimi için uyarıcı olabilir (3,4,9,11). Bununla beraber, bazı ESBL-olumlu olan bakterilerle yapılan rutin duyarlılık deneylerinde, bu kökenler yanlışlıkla duyarlı olarak tanımlanabilir ve bu durum da tedavi başarısızlıklara yol açar. Bundan dolayı ESBL varlığını belirlemede çeşitli yöntemler önerilmektedir. Bunlar, standard inokulumdan daha yüksek inokulumların kullanıldığı dilüsyon yöntemleri, çift diskli sinerji testi, üç boyutlu test, otomatize sistemler (Vitek) ve E testidir (4,11). Laboratuvarlarda en sık kullanılan test, çift diskli sinerji testidir. Ancak bu testin güvenilirliğini azaltan bazı faktörler vardır. Bu faktörler; bazı sefalosporinlerle sinerjinin engellenmesi, klavulanik asidin tüm ESBL'leri inhibe edememesi, diskler arası uzaklığın test sonucunu etkilemesi ve klavulanik asidde meydana gelebilecek potans kaybının yanlış negatif sonuçlara yol açmasıdır. Üç boyutlu yöntemde ise, hem beta-laktamaz substrat profili hem de antibiyotik duyarlılığı birlikte saptanabilir (4).

Bu çalışmada, çift diskli sinerji testi ile 51 *E.coli* kökeninin %18'inde, üç boyutlu test ile %25'inde ESBL üretimi saptandı. Bu oranlar *K. pneumoniae* kökenlerinde ise sırasıyla %43 ve %46 olarak bulundu. İstatistiksel değerlendirmede çift diskli sinerji testi ile üç boyutlu test arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Thomson ve arkadaşları (4), ESBL-pozitif olduğu bilinen kökenlerle ilgili yaptıkları çalışmada, ESBL üretimini çift diskli sinerji testi ile %79, üç boyutlu test ile %93 oranında saptamışlardır ve sonuç olarak üç boyutlu testin ESBL'leri belirlemede daha hızlı ve daha duyarlı bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır. Derbentli ve arkadaşları (9)'nın yaptığı bir çalışmada ise ESBL

üretimi, çift diskli sinerji testi ile %35, üç boyutlu test ile %43 olarak bulunmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde iki yöntem arasında ESBL üretimini saptama açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fakat araştırmacılar daha fazla kökenle çalışıldığı takdirde farkın anlamlı olabileceğini belirtmişlerdir. Yine 1997 yılında yapılan bir başka çalışmada, 67 *K.pneumoniae* kökeninin 10'unda ESBL olumluluğu saptanmış ve bu 10 kökenin sekizinde hem çift diskli sinerji testi, hem de üç boyutlu testle ESBL varlığı belirlenmiştir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmanın sonucunda ESBL üreten bakterilerin araştırılmasında pratik uygulama kolaylığı nedeniyle çift diskli sinerji testinin güvenle kullanılabilir bir yöntem olduğunu da bildirmişlerdir (12).

Sunulan bu çalışmada, ESBL aktivitesini belirlemede çift diskli sinerji testi ve üç boyutlu test istatistiksel olarak birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Sonuç olarak her iki test de ESBL belirlemede güvenle uygulanabilecek yöntemler olmasına rağmen, pratikte uygulama kolaylığı açısından çift diskli sinerji testinin tercih edilebileceği yorumu yapılmıştır.

### Kaynaklar

- Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1697-704
- George JA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 164-9
- Büyükbaba Ö, Aydın D, Anđ Ö. İdrar yolu infeksiyonu etkeni Gram-negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazların çift disk sinerji yöntemi ile belirlenmesi. *Klinik Derg* 1996; 9: 27-30
- Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double disk and three dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1877-82
- Sirof DL, Goldstein FW, Soussy CJ, et al. Resistance to cefotaxime and seven other  $\beta$ -lactams in members of the family Enterobacteriaceae: a 3 year survey in France. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1677-81
- Papanicolaou GA., Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase (MIR-I) conferring resistance to oxyimino- and amethoxy  $\beta$ -lactams in clinical isolates of *K.pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2200-9
- Jacoby GA, Carreras I. Activities of  $\beta$ -lactam antibiotics against *E.coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 858-62
- Eskitürk A, Korten V, Söyletir G. Akut bakım gerektiren hastalarda gelişen infeksiyonlardan izole edilen Klebsiella türlerinde antibakteriyel duyarlılık paternlerinin ve geniş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının araştırılması. *Ankem Derg* 1996; 10: 14-8
- Derbentli Ş, Katrancı H, Nakiboğlu Y. Gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların belirlenmesinde üç boyutlu yöntem ve çift disk sinerji yönteminin karşılaştırılması. *Ankem Derg* 1996; 10: 1-13
- Livermore DM.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-84
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. 4th ed. Approved Standard. NCCLS Document M2-A4. Villanova, Pa: NCCLS, 1990
- Akyıldız R, Altunay H, Özsoy MF, Koçak N, Çavuşlu Ş, Yenen OŞ. Klebsiella pneumoniae suşlarında çift disk sinerji testi ve üç boyutlu test ile ESBL sıklığının araştırılması. In: Tümbay E, İnci R, Hilmioglu Z, eds. *3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler* (16-22 Mayıs 1997, Kuşadası) *Konferans-Simpozyum Metinleri ve Serbest Bildiri Özetleri Kitabı*. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 1997: 335

**Tablo 2. ESBL Belirlemede Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması (Tutarlılık Analizi)**

Kökenler	Testler	Gözlenen Tutarlılık	Sonuca Bağlı Tutarlılık	Kappa Değeri	Anlamlılık p
<i>E.coli</i> (n=51)	1-2	0.84	0.61	0.54	0.00003
<i>K.pneumoniae</i> (n=46)	1-2	0.93	0.50	0.86	0.000001
Toplam	1-2	0.88	0.56	0.74	0.0000001

1: Çift diskli sinerji testi; 2: Üç boyutlu test