

**GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ TESPİTİNDE E-TEST İLE
ÇİFT DİSK SİNERJİ TESTİNİN KARŞILAŞTIRILMASI VE DİSKLER ARASI
UZAKLIĞIN SONUCA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI***Esragül AKINCI¹Nihal KARABİBER¹Hasan KILIÇ¹Mehmet KARAHAN¹**ÖZET**

Çift disk sinerji testi genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) üreten suşların tespitinde laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, rutin antibiyogram testlerinde sefalosporinlere ve aztreonama dirençli bulunan 26 *Klebsiella pneumoniae*, yedi *Enterobacter* spp ve üç *Escherichia coli* suşunda E-test ile çift disk sinerji testinin ESBL tespitindeki performansı değerlendirilmiş ve diskler arası uzaklığın sonuca etkisi araştırılmıştır. Çift disk sinerji testi, amoksisilin-klavulanat ile seftazidim, sefotaksim ve aztreonam diskleri arasındaki uzaklık 20 mm ve 30 mm olmak üzere iki şekilde yapılmıştır.

E-test ve diskler arası uzaklık 20 mm'ye ayarlanmış çift disk sinerji testinde suşların tümünde ESBL pozitif bulunmuştur. Diskler arası uzaklık 30 mm'ye çıkarıldığında ise 36 suşun 28'inde ESBL tespit edilmiş, diğer iki yöntemle karşılaştırıldığında suşların % 22'sinde ESBL saptanamamıştır.

Sonuç olarak, ESBL tespitinde diskler arası uzaklığın sonucu etkilediği, E-testin de ESBL tespitinde güvenilir bir yöntem olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, E-test, çift disk sinerji testi

**COMPARISON OF E-TEST AND DOUBLE DISK SYNERGY TEST DETECTION
OF EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE, AND INVESTIGATION
OF THE EFFECT OF DISTANCE BETWEEN DISKS ON THE RESULTS****SUMMARY**

Double disk synergy test is commonly used in the laboratories for detection of the extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing strains. In this study, the performance of E-test and double disk synergy test were compared for detection of ESBL production by 26 *Klebsiella pneumoniae*, seven *Enterobacter* spp and three *Escherichia coli* strains which were resistant to the cephalosporins and aztreonam. In addition, the effect of the distance between the disks on the result was investigated. Antibiotic disks (cefotaxime, ceftazidime, aztreonam) were placed 30 mm and 20 mm apart from the amoxicillin-clavulanate disk.

ESBL production was detected in all of the isolates by E-test and double disk synergy test when the distance was 20 mm apart. When the distance was increased to 30 mm, 28 of 36 strains were ESBL producers. Compared to other two methods, 22 % of the strains were detected as ESBL negative.

In conclusion, the distance between the disks effects the results and E-test was found a reliable method for detection of ESBL.

Key words: Extended spectrum beta-lactamases, E-test, double disk synergy test

* Bu çalışma, 15-19 Ekim 2001 tarihlerinde Adana'da gerçekleştirilen X. KLİMİK Kongresinde sunulmuştur.

¹Yüksek İhtisas Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sıhhiye, Ankara

Geliş tarihi: 02.01.2002

Kabul edilme tarihi: 26.02.2002

Yazışma adresi: Esragül AKINCI, Seğmen Sitesi, A Blok, No: 15, Karakusunlar, Ankara

GİRİŞ

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (extended spectrum beta-lactamase: ESBL) Bush sınıflamasında grup 2b'de yer almaktadırlar (1). Aztreonam ve oksiiimino-sefalosporinleri hidroliz eden enzimlerdir (2). Karbapenemler ve sefamisinlere etkisizdirler; beta-laktamaz inhibitörleriyle inaktive olurlar (3).

İlk kez 1983 yılında Almanya'da gösterilmiş ve günümüze kadar 30'un üzerinde ESBL tanımlanmıştır (4). Tüm dünyada yaygın olarak görülen bu direnç çoğunlukla *Klebsiella* suşlarında görülmekte, daha az oranda diğer Gram negatif enterik bakterilerde tespit edilmektedir (3).

Laboratuvarlarda ESBL üreten suşların *in vitro* tanımlanabilmesi için bazı yöntemler önerilmektedir. Bunlar; antibiyotik duyarlılık testlerinde daha yüksek bakteri inokulumu kullanılması, geniş spektrumlu sefalosporin ya da aztreonam duyarlılığında azalma gözlenmesi, çift disk sinerji testi, üç boyutlu test, E-test gibi yöntemlerdir (1,2,5).

Bu çalışmada rutin antibiyogram testlerinde sefalosporinler ve aztreonama dirençli bulunan 26 *K.pneumoniae*, yedi *Enterobacter* spp ve üç *E.coli* suşunda ESBL tespitinde E-test ile çift disk sinerji testi karşılaştırılmıştır. Çift disk sinerji testinde diskler arası uzaklık 20 mm ve 30 mm olmak üzere iki şekilde düzenlenerek diskler arası uzaklığın sonuca etkisi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Rutin antibiyogramlarda, NCCLS kriterlerine göre, sefalosporinlere ve aztreonama dirençli bulunan 26 *K.pneumoniae*, yedi *Enterobacter* spp ve üç *E.coli* suşu çalışmaya alınmıştır (6). Bakteri süspansiyonları 0.5 McFarland bulanıklığına göre ayarlanarak kullanılmış ve her bir bakteri için üç adet Mueller Hinton besiyerine ekim yapılmıştır. Plakların birine seftazidim (TZ) ve seftazidim-klavulanatın (TZL) çeşitli konsantrasyonlarını içeren E-test (AB Biodisk, İsveç) şeridi yerleştirilmiştir. Diğer iki plağa, merkeze amoksisilin-klavulanat diski (AMC, 20/10 mcg), çevreye ise merkezden merkeze uzaklığı 20 mm ve 30 mm olacak şekilde seftazidim (CAZ, 30 mcg), sefotaksim (30 mcg) ve aztreonam (30 mcg) diskleri konulmuştur. Plaklar 35°C'da bir gece inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. Bakteri inhibisyonunun E-test şeridi ile

kesiştirildiği noktadaki konsantrasyon o antibiyotik için MİK değeri olarak kabul edilerek, üretici firmanın önerileri doğrultusunda, TZ/ TZL oranının ≥ 8 olması ESBL pozitifliği olarak değerlendirilmiştir. Çift disk sinerji testinde, disklerden herhangi birinin zonunda AMC diskine doğru oluşan belirgin uzama ESBL pozitifliği olarak belirlenmiştir (5).

BULGULAR

Çift disk sinerji testinde diskler arası uzaklık 20 mm olduğunda suşların tümünde ESBL pozitif bulunurken uzaklık 30 mm'ye çıkarıldığında 28'inde ESBL tespit edilmiştir (Tablo 1). Suşların %22'sinde (altı *K.pneumoniae*, iki *Enterobacter* spp) 30 mm'de ESBL negatif bulunmuştur.

E-test ile suşların tümünde TZ / TZL oranı ≥ 8 olarak saptanmıştır. Bu suşlarda TZ MİK değeri ≥ 32 olarak bulunurken TZL MİK değeri ≤ 4 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 1: ESBL tespitinde kullanılan yöntemlerden elde edilen sonuçlar

	ESBL pozitif (n)	ESBL negatif (n)
Çift disk sinerji testi (20 mm)	36	0
Çift disk sinerji testi (30 mm)	28	8
E-test	36	0

TARTIŞMA

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, TEM ve SHV enzimlerini kodlayan genlerin mutasyonu sonucu oluşmaktadırlar (4). Bu mutasyon nedeniyle enzimin oksiiimino-sefalosporinlere karşı afinitesi ve hidrolitik etkisi artmaktadır (2,4). Bazı ESBL'lar tüm oksiiimino-sefalosporinlere yüksek düzeyde direnç sağlarken bazılarında direnç düşük düzeyde olmakta ya da selektif olarak belli beta-laktamlara karşı gelişmektedir (2). Düşük aktivitede ESBL üreten suşların laboratuvarında tespiti güç olmaktadır. Bu suşlar kolaylıkla gözden kaçabilmektedir. Bu nedenle ESBL pozitif suşların *in vitro* tanımlanabilmesi için bazı yöntemler

geliştirilmiştir. Bunlar antibiyotik duyarlılık testlerinde daha yüksek bakteri inokulumu kullanılması, geniş spektrumlu sefalosporin ya da aztreonam duyarlılığında azalma tespit edilmesi, çift disk sinerji testi, üç boyutlu test, E-test gibi yöntemlerdir (1,2,5). NCCLS, 1997 yılında yayınladığı klavuzunda, seftazidim zon çapı ≤ 22 mm, aztreonam ve sefotaksim zon çapları ≤ 27 mm olan *E.coli* ve *Klebsiella* suşlarının ESBL üretme olasılığı olan suşlar olarak kabul edilebileceğini bildirmektedir (6). Bu çalışmada, bu zon çapları esas alınarak, ESBL üretme olasılığı olan suşlar tespit edilmiş ve bunlara çift disk sinerji ve E-test uygulanmıştır.

Çift disk sinerji testi uygulaması kolay bir yöntem olduğundan laboratuvarlarda çok kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu yöntemin duyarlılığı %100 değildir ve diskler arası uzaklığın standardizasyonu bulunmadığı için yalnız negatif sonuçlar alınabilmektedir (5). Yapılan bazı çalışmalarda diskler arası uzaklığın 30 mm'den 20 mm'ye indirilmesinin duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir. Gülay ve ark. (7) 44 *K.pneumoniae* suşunda, diskler arası uzaklık 30 mm ve 20 mm olduğunda alınan sonuçları karşılaştırmışlar ve sırasıyla %56.8 ve %88.6 oranlarında ESBL saptamışlardır. Bu çalışmada, inhibisyon zon çapları daraldıkça bu tür yalancı negatif sonuçların alınabileceği, böyle durumlarda diskler arası mesafenin daralmasının sinerjiyi belirgin hale getirebileceği bildirilmiştir. Kuzucu ve ark. (8)

diskler arası uzaklığın 20 mm olması halinde 42 suşta, 30 mm olması halinde ise sadece dokuz suşta ESBL gösterdiklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, diskler arasındaki uzaklığın 20 mm'ye indirilmesinin testin duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir.

E-test ESBL tespitinde kullanılan diğer bir yöntemdir. Bu yöntem sabit konsantrasyonda (2 mcg/ml) klavulanat varlığında seftazidim MİK değerinde düşme gözlenmesi prensibine dayanmaktadır. E-test ESBL şeridinin bir tarafı stabil konsantrasyonlarda seftazidim, diğer tarafı ise seftazidim klavulanat içermektedir. Bazı çalışmalarda ESBL tespitinde en güvenilir yöntemlerden biri olarak E-test gösterilmektedir. Cormican ve ark. (9) 82 klinik izolatla yaptıkları çalışmada E-test'i %100 oranında duyarlı bulmuşlardır. Aynı çalışmada çift disk sinerji testinin (diskler arası 25 mm) duyarlılığı %87'dir. Abacıoğlu ve ark. (10) ise çalışmalarında çift disk sinerji testinin E-test'den daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Hastane enfeksiyonlarından soyutlanan 24 *K.pneumoniae* suşunda E-test ile 12 suşta, çift disk sinerji testi ile 15 suşta ESBL saptamışlardır. Bizim çalışmamızda suşların tümünde E-test ile ESBL tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada; çift disk sinerji testinde, diskler arası uzaklığın sonucu etkilediği görülmüştür. Ayrıca pahalı bir yöntem olan E-test'in ESBL tespitinde güvenilir bir yöntem olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Vahaboğlu H: Beta-laktamaz tanı testlerinin rutin kullanımı ve klinik önemi. Flora Derg 1998; 3: 73-9.
2. Jacoby GA, Han Paula. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microb 1996; 34: 908-11.
3. Gold HS, Moellering RC. Antimicrobial drug resistance. New Engl J Med 1996; 335: 1445-53.
4. Livermore DM, Yuan M. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp from intensive care units in Europe. J Antimicrob Chemother 1996; 38: 409-24.
5. Bal Ç. Beta-laktamaz testleri ve rutinde kullanımları. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı, Özet kitabı, s: 101, İstanbul (1997). Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 33.
6. NCCLS: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 6 th ed. Pensilvanya: Wayne, 1997.
7. Gülay Z, Abacıoğlu YH, Yuluğ N. Çift disk sinerji yönteminde diskler arası uzaklığın sonuca etkisi. Enfeksiyon Derg 1995; 9: 89-92.
8. Kuzucu Ç, Kabakçioğlu M, Özışık A, Ezen FO, Acar NS. Nozokomiyal Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta-laktamaz varlığının saptanması. Flora Derg 1999; 4: 102-6.

AKINCI, KARABİBER, KILIÇ, KARAHAN. GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ TESPİTİNDE E-TEST İLE ÇİFT DİSK SİNERJİ

9. Cormican MG, Marshall A, Jones RN. Detection of extended-spectrum beta-lactamase producing strains by the E-test ESBL screen. J Clin Microbiol 1996; 34: 1880-4.
10. Abacıoğlu YH, Yücesoy M, Gülay Z, Yuluğ N. 'Extended-spectrum beta-lactamases' saptanmasında E-testi ile çift disk sinerji yöntemlerinin karşılaştırılması. İnfeksiyon Derg 1995; 9: 93-5.