

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ SAPTANMASINDA İKİNCİ, ÜÇÜNCÜ VE DÖRDÜNCÜ KUŞAK SEFALOSPORİNLERİN ÇİFT DİSK SİNERJİ TESTİNDE KULLANILMASI VE SEFOKSİTİN DUYARLILIĞI

Birgül KAÇMAZ*, Gülden ECE**

*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA

**Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Fenotipik doğrulama testi ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi saptanan 170 *Escherichia coli* ve 40 *Klebsiella* spp. suşunda ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlerin çift disk sinerji (ÇDS) testi ile klavulanat sinerjisi gösterme oranları araştırılmış, aynı zamanda bakterilerin sefoksitin duyarlılığına bakılmıştır. Klavulanat sinerjisi sekiz antibiyotik diski (sefuroksim, sefiksime, sefotaksim, seftazidim, seftizoksime, seftriakson, sefepim ve aztreonam) amoksisilin-klavulanik asit diskinden 25-20 mm uzağa yerleştirilerek belirlenmiştir. Sefepim ve seftazidimin diskler arası aralık farkı gözetmeksizin, tüm suşlarda sinerji gösterdikleri bulunmuştur. Diğer antibiyotiklerin 25 mm aralıkta klavulanat sinerjisi saptama oranları % 12-98 arasında değişmiştir. Aralığın 20 mm'ye düşürülmesi ile klavulanat sinerjisinin görülme oranı yükselmiş, aztreonam, seftriakson, sefotaksim ve seftizoksime ile sinerji görülme oranı % 100 bulunmuş, sefiksime ve sefuroksimde % 88 ve % 20 oranları saptanmıştır. Sefoksitine *Klebsiella* spp. suşlarının tamamı duyarlı, *E.coli* suşlarının ise 162'si duyarlı, 8'i (% 5) dirençli bulunmuştur.

Sonuç olarak ÇDS testinde en duyarlı antibiyotiklerin sefepim ve seftazidim olduğu bulunmuştur. Seftriakson, sefotaksim ve seftizoksimin ÇDS testinde birbirlerini tam uyumlu bir şekilde temsil ettiği görülmüştür. GSBL üreten bakterilerin beraberinde AmpC beta-laktamaza sahip olması ve/veya porin geçirgenliğindeki mutasyonlar nedeniyle, sefoksitine her zaman duyarlı olarak saptanamayacağı bilinmelidir.

Anahtar sözcükler: çift disk sinerji testi, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, GSBL, sefoksitin duyarlılığı

SUMMARY

The Use of Second, Third and Fourth Generation Cephalosporins in Double Disk Synergy Test for Detection of Extended-spectrum Beta-lactamases and the Susceptibility of Strains to Cefoxitin

Clavulanate synergy rates of second, third and fourth generation cephalosporins with double disk synergy (DDS) test were investigated in 170 *Escherichia coli* and 40 *Klebsiella* spp. strains producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) detected by phenotypic confirmation. Also cefoxitin susceptibility of these bacteria were screened. Clavulanate synergy was determined by placing eight antibiotic disks (cefuroxime, cefixime, cefotaxime, ceftizoxime, ceftriaxone, cefepime and aztreonam) at a distance of 25-20 mm from amoxicillin-clavulanate disk. Cefepime and ceftazidime were found to show synergy in all isolates independent from the distance between cephalosporins and clavulanate disk. Clavulanate synergy rates of other antibiotics with a distance of 25 mm were ranging from 12 % to 98 %. Clavulanate synergy rates were increased by reducing the distance to 20 mm. Synergy rates of aztreonam, ceftriaxone, cefotaxime and ceftizoxime were found to be 100 %, cefixime 88 % and cefuroxime 20 % in 20 mm distances. All *Klebsiella* spp. strains were found sensitive to cefoxitin. Cefoxitin resistance were found in 8 (5 %) *E.coli* strains. In conclusion, cefepime and ceftazidime were found as the most sensitive antibiotics in DDS test. It was found that ceftriaxone, cefotaxime and ceftizoxime represented each other with complete accordance in DDS tests. It should be considered that ESBL producing bacteria could concurrently produce AmpC beta-lactamases and/or may have mutations in porin permeability so that, they may not be found susceptible to cefoxitine.

Keywords: cefoxitine susceptibility, double disk synergy test, ESBL, extended-spectrum beta-lactamases

İletişim adresi: Birgül Kaçmaz, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA

Tel: (0312) 202 54 77

e-posta: kacmazbirgul@mynet.com

Alındığı tarih: 14.12.2009, revizyon kabulü: 24.03.2010

GİRİŞ

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) plazmidler aracılığıyla taşınan bakteriyel enzimlerdir. Bu enzimler üçüncü kuşak oksimino-sefalosporinleri ve monobaktamları (aztreonam) hidrolize ederek bakterinin bu antibiyotiklere karşı dirençli olmasını sağlarlar ve klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olurlar. GSBL üreten bakteriler sefamisinlere (sefoksitin) ve karbapenemlere duyarlıdır⁽¹²⁾.

GSBL üretiminin saptanması için en sık kullanılan yöntem sefalosporinler (seftriakson, sefotaksim, sefpodoksim) ve aztreonam ile beta-laktamaz inhibitörü (örn., klavulanik asit) arasındaki sinerjik etkinin gösterilmesidir. Çift disk sinerji (ÇDS) testi, kombine disk testi, GSBL E-test, otomatize metod ve üçlü yayılım testi bu sinerjinin gösterilmesi esasına dayanan testlerdir⁽⁴⁾.

Enterobacteriaceae üyelerinde GSBL üretimi saptamak amacıyla laboratuvarlarda en sık kullanılan metod ÇDS testidir. Bu testte amoksisilin-klavulanik asit (AMC) diskinin merkezden merkeze uzaklık 20-30 mm olacak şekilde seftazidim, seftriakson, sefotaksim ve aztreonam diskleri yerleştirilir. Bu antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonlarının AMC diski yönünde genişleme göstermesi (sinerji) veya diskler arasındaki bölgede bir inhibisyon alanının gözlenmesi GSBL üretimi olarak değerlendirilir^(4,10). Ancak ÇDS testinin güvenilirliğini azaltan çeşitli faktörler bulunmaktadır. Diskler arasındaki uzaklığın testin sonucunu etkilediği, uzaklığın 25-30 mm olarak ayarlandığı durumlarda yanlış negatif sonuçların olabildiği saptanmıştır. Özellikle indüklenabilir kromozomal AmpC beta-laktamazını yüksek düzeyde sentezleyen *Enterobacteriaceae* üyelerinde, inhibisyon zonu oluşmaması veya küçük inhibisyon zonu oluşması nedeniyle sinerji testi negatif sonuç verilmektedir. Böyle durumlarda diskler arası mesafenin 20 mm tutulması veya kromozomal beta-laktamazlardan çok az etkilenen sefepim veya sefpirom disklerinin kullanılması ile deneyin tekrarlanması önerilmektedir^(4,5,15). ÇDS testinin esas klavulanat ile beta-laktam arasındaki yardımlaşmaya dayandığından klavulanata

dirençli GSBL taşıyan bakteriler bu yöntemle saptanamamaktadır⁽¹³⁾.

Bu çalışmada GSBL üretimi saptanan bakterilerde seftriakson, sefotaksim, seftazidim ve aztreonam ile birlikte sefepim, seftizoksim, sefuroksim ve sefiksim de ÇDS testinde kullanılmıştır. Bu antibiyotiklerin ÇDS testinde GSBL saptama oranları araştırılmıştır. Aynı zamanda bakterilerin sefoksitin duyarlılığına bakılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli kaynaklardan infeksiyon etkeni olarak izole edilen ve GSBL üretimi saptanan 170 *Escherichia coli* ve 40 *Klebsiella* spp. suşu kullanılmıştır. Bakteriler klasik yöntemlerle tanımlanmıştır. Bakterilerde GSBL üretimi Clinical and Laboratory Standards Institute'ün önerdiği şekilde fenotipik doğrulama testi ile araştırılmıştır. Fenotipik doğrulama testinde sefotaksim (30 µg), seftazidim (30 µg) tek başına ve sefotaksim/klavulanik asit (30/10 µg), seftazidim/klavulanik asit (30/10 µg) kombine diskler kullanılmıştır. Test edilen antimikrobik ilaçlardan birinin zon çapının klavulanik asit ile birlikte test edildiğinde tek başına test edilmesine göre ≥5 mm artması GSBL üretimi olarak değerlendirilmiştir⁽³⁾.

Fenotipik doğrulama testi ile GSBL üretimi saptanan 210 bakteri suşu çalışmada kullanılmıştır. Sekiz beta-laktam antibiyotik diski çift disk sinerji yöntemi ile test edilmiştir⁽⁷⁾. McFarland 0.5'e göre ayarlanan bakteri süspansiyonu, Mueller-Hinton agara (Oxoid) ekilmiştir. Ardından ikinci kuşak sefalosporinler olan sefoksitin (30 µg) ve sefuroksim (30 µg); üçüncü kuşak sefalosporinler olan sefiksim (5 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim (30 µg), seftizoksim (30 µg), seftriakson (30 µg); dördüncü kuşak sefalosporin olan sefepim (30 µg) ve monobaktam bir antibiyotik olan aztreonam (30 µg) diskleri AMC (20/10 µg) diskinin merkezden merkeze 25 mm uzağa yerleştirilmiştir. 37°C'de 18-24 saat inkubasyondan sonra beta-laktam ve AMC diski arasındaki sinerjinin göstergesi olarak inhibisyon zonuna veya zonda genişleme olmasına bakılmıştır. Antibiyotikler arasında bir

etkileşimin gözlenmediği suşlarda diskler arası merkezden merkeze 20 mm olarak ayarlanmış ve test tekrar edilmiştir.

Çalışmada kullanılan tüm antibiyotik diskleri ve kombine diskler Oxoid firmasından (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) sağlanmıştır. Aynı zamanda tüm antibiyotik disklerinin kalite kontrolleri CLSI M100-S18'in önerdiği şekilde *E.coli* ATCC 25922 suşu kullanılarak yapılmıştır⁽³⁾. Aynı suş negatif kontrol olarak da kullanılmıştır.

BULGULAR

Antibiyotik disklerinin AMC diskine merkezden merkeze 25 mm ve 20 mm aralıkla yerleştirildiği testlerde alınan sinerji sonuçları Tabloda gösterilmiştir.

Diskler arası 25 mm olduğunda klavulanat sinerjisini saptama oranları % 12-100 arasında değişmiş, bu aralıkta klavulanat sinerjisi görülmeyen antibiyotiklerde aralığın 20 mm'ye düşürülmesi ile klavulanat sinerjisinin görölme oranı yükselmiştir. Sefepim ve seftazidimde 25 mm aralıkta da % 100 sinerji saptanmış, bu aralıkta aztreonamla % 98, seftriakson, sefotaksim ve seftizoksime % 96 bulunan sinerji 20 mm aralıkta % 100'e, sefiksimde % 82'den % 88'e, sefuroksimde % 12'den % 20'ye çıkmıştır (Tablo).

Sefoksitine *Klebsiella* spp. suşlarının tamamı duyarlı, *E.coli* suşlarının 162'si duyarlı, 8'i (% 5) dirençli bulunmuştur.

Tablo. ÇDS testinde AMC diskine 25 mm ve 20 mm aralıkla yerleştirilen antibiyotik diskleri ile saptanan sinerji [n(%)].

Antibiyotik	25 mm aralıkla	20 mm aralıkla
Sefepim	210 (100)	210 (100)
Seftazidim	210 (100)	210 (100)
Aztreonam	206 (98)	210 (100)
Seftriakson	202 (96)	210 (100)
Sefotaksim	202 (96)	210 (100)
Seftizoksime	202 (96)	210 (100)
Sefiksim	172 (82)	185 (88)
Sefuroksim	25 (12)	42 (20)

TARTIŞMA

Çift disk sinerji testi GSBL üretiminin belirlenmesinde uygulanması ve değerlendirilmesi kolay bir yöntemdir. İnhibisyon zon çapı-

nın ölçülmesine gerek olmayan, sadece sinerjinin varlığı veya yokluğunun görülmesi ile değerlendirilen bir testtir. AMC diski ve seçilen sefalosporin diski arasındaki aralık önemlidir. Diskler arasındaki uzaklığın deneyin sonucunu etkilediği, bazen diskler arasındaki uzaklığın 25-30 mm olarak ayarlandığı deneylerde yanlış negatif sonuçlar elde edildiği bilinmektedir. Bu nedenle AMC ve test edilen sefalosporinler ve aztreonamın etrafında bir inhibisyon zonu yoksa veya çok küçükse diskler arasındaki aralık küçültülerek testin tekrarlanması önerilir⁽⁴⁾. Bu çalışmada da 25 mm aralıkta sefepim ve seftazidim dışındaki sefalosporinlerin ve aztreonamın suşların % 2-88'inde klavulanat ile sinerji göstermediği saptanmıştır. Bu antibiyotiklerin ÇDS testinde aralığın 20 mm'ye düşürülmesiyle klavulanat ile sinerji görölme oranlarında artış görülmüştür. Yapılan çalışmalarda da diskler arasındaki uzaklığın GSBL saptanmasındaki önemi vurgulanmıştır. Disklerin yaklaştırılmasıyla birlikte önceki negatif sonuçların büyük oranda GSBL yönünden pozitifleştiği saptanmıştır^(1,6,9).

Bu çalışmada sefuroksimin en az oranda klavulanat sinerjisi gösteren antibiyotik olduğu bulunmuştur. Üçüncü kuşak sefalosporinlerden seftriakson, sefotaksim ve seftizoksimin klavulanat sinerjisi gösterme oranlarının aynı olduğu görülmüştür. Bu üç antibiyotiğin birbirlerini ÇDS testinde temsil edebileceği saptanmıştır.

Sefepim ve seftazidimin diskler arası mesafe farkı gözetmeksizin tüm suşlarda klavulanat sinerjisi gösterdikleri bulunmuştur. Kaçmaz ve ark.⁽⁸⁾'nin bir araştırmasında da GSBL saptanmasında seftazidimin seftriakson ve sefotaksime göre daha üstün olduğu bulunmuştur. Yapılan bazı çalışmalarda sefepimin ÇDS testinde seftriakson ve sefotaksime göre daha üstün olduğu gösterilmiştir. Çeşitli bakteriyel suşlar GSBL ile birlikte indüklenebilir veya stabil kromozomal kaynaklı AmpC sefalosporinaz enzimlerine sahip olabilirler. AmpC beta-laktamaz indüklenebilir olduğu zaman klavulanat ile sinerjistik etki kolaylıkla saptanabilir. Ama AmpC beta-laktamaz stabil ise sinerji sıklıkla görülmeyebilir. Sefepim AmpC sefalosporinaz enziminden daha az etkilenir. GSBL ile birlikte AmpC beta-laktamaz taşıyan suşlarda

GSBL'nin saptanmasında alternatif sefalosporin olarak sefepim kullanılması önerilmektedir^(5,15). Bu çalışmada sefepim ve seftazidim tüm suşlarda klavulanat sinerjisi göstererek GSBL üretimini saptamışlardır. Sefepimin 25 mm aralıkta seftazidim ile eşit derecede, diğer test edilen antibiyotiklere göre daha duyarlı olduğu görülmüştür.

Sefoksitin GSBL'nin hidrolitik etkisine dirençlidir. Bu nedenle GSBL üreten bakteriler sefoksitine duyarlıdır⁽¹³⁾. *Enterobacteriaceae* üyelerinde görülen sefoksitin direncinin AmpC beta-laktamaz üretimi için bir gösterge olduğu kabul edilir⁽¹¹⁾. Ama beta-laktamaz enziminden ilişkisiz olarak GSBL üreten bakterilerde porin geçirgenliğindeki mutasyonlar nedeniyle sefoksitine direncin saptanabileceği çalışmalarda belirtilmiştir^(2,14). Bu çalışmada sefoksitine 8 (% 5) *E.coli* suşunda direnç saptanmıştır. Bu direnç porin geçirgenliğindeki değişiklik sonucu olabileceği gibi suşlarda AmpC beta-laktamaz varlığı sonucunda da olabilir. Bunun açıklanabilmesi için ileriye dönük çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak bu çalışmada ÇDS testinde en uygun olan antibiyotiklerin sefepim ve seftazidim olduğu bulunmuştur. Seftriakson, seftaksim ve seftizoksimin klavulanat sinerjisi gösterme oranlarının aynı olduğu, bu nedenle ÇDS testinde bu antibiyotiklerin birbirlerini tam uyumlu bir şekilde temsil ettiği görülmüştür. GSBL üreten suşların beraberinde AmpC beta-laktamaza sahip olması ve/veya porin geçirgenliğindeki mutasyonlar nedeniyle sefoksitine karşı her zaman duyarlı olarak saptanamayacağı bilinmelidir.

KAYNAKLAR

1. Akata F, Oktun M, Teker B, Karabay O, Ögütlü A, Tuğrul M, Dündar V: Nozokomiyal gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta-laktamaz sıklığı, *İnfeksiyon Derg* 1997;11(3):255-9.
2. Ananthan S, Subha A: Cefoxitin resistance mediated by loss of a porin in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, *Indian J Med Microbiol* 2005;23(1):20-3.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement M2-A9 (M100-S18), CLSI, Wayne, PA (2008).
4. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V: Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide, *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 1):90-103.
5. Gupta V, Singla N, Chander J: Detection of ESBLs using third and fourth generation cephalosporins in double disk synergy test, *Indian J Med Res* 2007;126(5):486-7.
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, *Klinik Derg* 1998;11(2):59-60.
7. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A: Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns, *Rev Infect Dis* 1988;10(4):867-78.
8. Kaçmaz B, Çakır FÖ, Aksoy A: Hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* türlerinde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz saptanması, *ANKEM Derg* 2005;19(3):125-9.
9. Kuzucu Ç, Kabakçioğlu M, Özışık A, Osmanoğlu Ezen F, Acar NS: Nozokomiyal gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu ve kromozomal beta-laktamaz varlığının saptanması, *Flora Derg* 1999;4(2):102-6.
10. Livermore DM, Brown FJ: Detection of beta-lactamase-mediated resistance, *J Antimicrob Chemother* 2001;48(Suppl 1):59-64.
11. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP: Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes, *J Antimicrob Chemother* 2001;48(Suppl 1):87-102.
12. MacKenzie FM, Miller CA, Gould IM: Comparison of screening methods for TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase detection, *Clin Microbiol Infect* 2002;8(11):715-24.
13. Paterson DL, Bonomo RA: Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update, *Clin Microbiol Rev* 2005;18(4):657-86.
14. Sridhar Rao PN, Basavarajappa KG, Krishna GL: Detection of extended spectrum beta-lactamase from clinical isolates in Davangere, *Indian J Pathol Microbiol* 2008;51(4):497-9.
15. Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D: Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum beta-lactamases in an *Enterobacteriaceae* strain collection, *J Antimicrob Chemother* 2004;54(1):134-8.