

# ANAEROP GRAM NEGATİF ÇOMAKLARIN DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİNDE AGAR DİLÜSYON, E TEST VE BUYYONDA DİSK ELÜSYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI\*

Nezahat GÜRLER, Hengameh ZANDI, Kurtuluş TÖRECİ

## ÖZET

Çeşitli muayene maddelerinden izole edilen 86 anaerop Gram negatif çomağın anaerop bakterilere etkili olarak bilinen antibiyotiklerden sefoksitin ve klindamisine duyarlılıkları agar dilüsyon, E test ve buyyonda disk elüsyon yöntemleri ile belirlenmiş, sonuçlar birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

İstatistiksel değerlendirme 3 yöntemle alınan sonuçlar arasına anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur ( $p>0.05$ ).

## SUMMARY

*Comparison of agar dilution, E test and broth disk elution methods for susceptibility testing of anaerobic Gram negative rods.*

Eightysix anaerobic Gram negative rod strains isolated from various clinical specimens were tested by three methods for susceptibility against cefoxitin and clindamycin which are known as effective antibiotics for anaerobic bacteria. The methods used were agar dilution, E test and broth disk elution methods.

The results were compared with each other. The statistical analysis revealed that the differences between the results obtained by three methods were negligible ( $p>0.05$ ).

## GİRİŞ

Günümüzde anaerop bakteriyoloji ile ilgili çalışmaların yoğunlaşması, bu bakterilerin daha iyi ve kolay tanımlanmalarına olanak sağlamış, giderek klinik önemleri artmış ve birçok infeksiyondan sorumlu oldukları anlaşılmıştır. Anaerop bakterilerle oluşan infeksiyonların artmasıyla aerop bakterilerde olduğu gibi, bu bakterilerde de antimikrobik maddelere direnç sorunu ortaya çıkmıştır. Anaerop bakterilerde antimikrobik maddelere zaman içinde direnç gelişimi önemli bir artış göstermektedir (2,10,16).

Anaerop bakterilerin antimikrobik maddelere duyarlılığının saptanması için çeşitli yöntemler kullanılır. Bu yöntemlerden agar dilüsyon yöntemi, NCCLS'in önerdiği referans bir yöntemdir. Bu yöntemle alternatif olarak buyyonda mikrodilüsyon yöntemi bildirilmektedir. Anaerop bakterilerin duyarlılıklarının belirlenmesinde disk diffüzyon ve buyyonda disk elüsyon yöntemleri kullanılabilirse de, bu yöntemler NCCLS'in önermediği yöntemlerdir. Son yıllarda geliştirilen E testin anaerop bakterilerin duyarlılığı için de kullanılabilceği bildirilmektedir (1,2,3,5,9,10,11,17,18).

\* 11. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde sunulmuştur (2-6 Haziran 1996, Kuşadası).

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Çapa, İstanbul.

Anaerob bakterilerin izolasyon ve identifikasyonları zaman alıcıdır. Bu nedenle duyarlılık deneylerinin yapılması, sonucunun bildirilmesi de uzun sürer. Ancak anaerob enfeksiyonlar ciddi seyirli, hatta öldürücü olabildiklerinden, tedavinin erken başlatılması gerekir. Çoğu kez anaerob enfeksiyon düşünüldüğüne ampirik olarak, anaerob bakterilere etkili olduğu bilinen antimikrobiklerle tedaviye başlanmaktadır. Antimikrobik maddelere direnç özellikle gelişigüzel antibiyotik kullanımının yaygın olduğu ülkelerde, daha hızlı gelişmektedir (3,4,6,7,11,18).

Antibiyotiklerin belli bir disiplin içinde uygulandığı ülkelere anaerob bakteriler için rutin duyarlılık deneylerinin her zaman gerekli olmadığı öne sürülmekte, ancak ciddi seyirli ve tekrarlayan enfeksiyonlar, yeni antibiyotiklerin kullanılması düşünüldüğü zamanlarda ve bazı özel durumlarda yapılması önerilmektedir. Ancak yakın zamana kadar direnç saptanmamış bazı antibiyotiklere de direnç saptanması, günümüzde anaerob bakterilerin duyarlılık deneylerini önemli kılmaktadır (4,11,16,17,18).

Bu yöntemlerden agar dilüsyon yöntemi kalite ve kantite açısından tüm yöntemlere oranla üstün, standart bir yöntem olmasına rağmen rutin olarak uygulanması güçtür ve ekonomik değildir (3,10,11,14,15,16).

Disk difüzyon yöntemi, anaerob bakterilerin birçoğunun güç üremesi ve anaerob bakteriler için standart inhibisyon zon çaplarının bulunmaması nedeniyle önerilmemektedir. 70'li yılların başında tarif edilen buyyonda disk elüsyon yöntemi özellikle kısa sürede sonuç vermesi nedeniyle birçok laboratuvar tarafından yıllarca kullanılmasına karşın, bu yöntemin de olumsuz yönleri bildirilmiştir ve NCCLS tarafından önerilmeyen bir yöntemdir (8,9,11,16,17).

Son yıllarda geliştirilen E test, agar dilüsyon yönteminin avantajlarını, disk difüzyon yönteminin kullanım pratikliğini sağlaması açısından anaerob bakteriler için de kullanılabilir bir yöntem olarak görülmektedir (2,10,11,12,13,15,18,20).

Bu çalışmada agar dilüsyon, E test ve buyyonda disk elüsyon yöntemi ile çeşitli anaerob Gram negatif çomakların duyarlılıkları yapılarak, sonuçları karşılaştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Muayene maddelerinden izole edilmiş 86 anaerob Gram negatif çomak suşunun klindamisin ve sefoksitine duyarlılıkları agar dilüsyon (AD), E test (ET) ve buyyonda disk elüsyon yöntemi (BDE) ile deneyerek sonuçları karşılaştırılmıştır. Deneylerde bakterilerin eğri besiyerindeki genç kültürlerinden (24-72 saatlik) Brucella buyyon besiyerinde 0.5 McFarland tüpünün bulanıklığında olacak şekilde süspansiyonlar hazırlanmıştır. Duyarlılık deneylerinde NCCLS'in önerdiği şekilde, pigmentless suşlar için Wilkins-Chalgren buyyon ve agar besiyeri, pigmentli suşlar için Brucella buyyon ve agar besiyeri kullanılmıştır. Tüm besiyerlerine hemin, vitamin K ve sistein monohidroklorür ilave edilmiştir.

AD ve ET'de besiyerleri 24-48 saat, BDE yönteminde ise 18-24 saat, 37°C'de GasPak kavanozda inkübe edilmişlerdir. AD yöntemi için sefoksitin 1-128 µg/ml, klindamisin için ise 0.25-64 µg/ml antibiyotik içeren dilüsyonları hazırlanmıştır. BDE yöntemi için 5 ml besiyerine herbiri 30 µg sefoksitin içeren 3 disk konarak besiyerinde 18 µg/ml sefoksitin konsantrasyonu veya herbiri 2 µg klindamisin içeren 8 disk konarak besiyerinde 3.2 µg/ml klindamisin konsantrasyonu sağlanmıştır.

AD ve ET'de MİK'un sefoksitin için  $\geq 32$  µg/ml, klindamisin için  $\geq 4$  µg/ml olması, BDE'da tüplerde üreme olması direnç işareti olarak alınmış, deneylerde antibiyotiksiz besiyerleri kontrol olarak kullanılmıştır.

## BULGULAR

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 38'i *Bacterides fragilis*, 15'i *B.vulgatus*, 7'si *B.ovatus*, 6'sı *B.thetaiotaomicron*, 6'sı *B.distasonis*, 8'i *Prevotella melaninogenica*, 2'seri *P.bivia*, *P.intermedia* ve *Porphyromonas asaccharolytica* olarak tanımlanmış 86 anaerob Gram negatif çomakların üç yöntemle yapılan duyarlılık deneylerinde alınan toplam sonuçlar tablo 1'de, bakteri türlerine göre alınan sonuçlar tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Üç yöntemle duyarlı ve dirençli olarak saptanan suş sayıları (ve % oranları).

	AD		ET		BDE	
	Du	Di	Du	Di	Du	Di
Sefoksitin	72 (84)	14 (16)	69 (80)	17 (20)	67 (78)	19 (22)
Klindamisin	77 (90)	9 (10)	73 (88)*	10 (12)	73 (85)	13 (15)

\* 83 suş denenmiştir. Diğer deneylerde 86 suş denenmiştir.

AD= Agar dilüsyon, ET= E test, BDE= Buyyonda disk elüsyon.

Du= Duyarlı, Di= Dirençli.

Sefoksitin için 64 suş 3 yöntemle de aynı sonucu vermiş, 57'si duyarlı, 7'si dirençli bulunmuştur. Diğer iki yöntemle duyarlı bulunan 4 suş AD ile, 4 suş ET ile, 7 suş BDE ile dirençli bulunmuştur. Diğer iki yöntemle dirençli bulunan 4 suş AD ile, 1 suş ET ile, 2 suş BDE ile duyarlı bulunmuştur.

Tablo 2. Anaerob Gram negatif çomak türlerinin üç yöntemle sefoksitin ve klindamisine duyarlılık sonuçları.

Bakteri (n)		AD		ET		BDE	
		Du	Di	Du	Di	Du	Di
B.fragilis (38)	Sefoksitin	32	6	32	6	27	11
	Klindamisin	34	4	32	6	32	6
B.vulgatus (15)	Sefoksitin	13	2	11	4	11	4
	Klindamisin	13	2	13	2	12	3
B.ovatus (7)	Sefoksitin	5	2	4	3	6	1
	Klindamisin	6	1	6	1	6	1
B.thetaiotaomicron (6)	Sefoksitin	5	1	4	2	5	1
	Klindamisin	5	1	5	1	3	3
B.distasonis (6)	Sefoksitin	4	2	4	2*	5	1
	Klindamisin	6	0	6	0	5	1
Prevotella melaninogenica (8)	Sefoksitin	8	0	8	0	8	0
	Klindamisin	8	0	6 *	0	8	0
Diğer pigmentli Gram (-) çomaklar (6)	Sefoksitin	6	0	5	1	4	2
	Klindamisin	6	0	4 **	1	3	3

\* 6 suş denenmiştir; \*\* 5 suş denenmiştir.

Klindamisin için üç yöntemle de denenen 83 suşun 66'sı aynı sonuçları vermiş, 62'si duyarlı, 4'ü dirençli bulunmuştur. Diğer iki yöntemle duyarlı bulunan 3 suş AD ile, 4 suş ET ile, 7 suş BDE ile dirençli bulunmuştur. Diğer iki yöntemle dirençli bulunan 1 suş AD ile, 1 suş ET ile duyarlı bulunmuştur. Yalnız AD ve BDE ile denenen 3 suş iki yöntemle de duyarlı bulunmuştur.

Değişik yöntemlerle şu farklı sonuçlar alınmıştır:

a) Sefoksitine standart yöntem olarak kabul edilen AD ile duyarlı bulunan 8 suş ET ile dirençli; AD ile dirençli bulunan 5 suş ET ile duyarlı bulunmuştur. Bu suşlar için iki yöntemle saptanan MİK'ler genellikle ancak bir dilüsyon kadar farklıdır. AD ile duyarlı bulunan 12 suş BDE ile dirençli, AD ile dirençli bulunan 5 suş ise BDE ile duyarlı; BDE ile duyarlı bulunan 6 suş ET ile dirençli, BDE ile dirençli bulunan 8 suş ise ET ile duyarlı bulunmuştur. *P.melaninogenica* suşlarında üç yöntemle farklı sonuç alınan suş bulunmamıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Üç yöntemle sefoksitin için farklı sonuç veren suş sayıları ve türlere dağılımı.

Bakteri (n)	Du:	AD	ET	AD	BDE	BDE	ET
	Dİ:	ET	AD	BDE	AD	ET	BDE
<i>B.fragilis</i> (38)		3	3	7	2	1	6
<i>B.vulgatus</i> (15)		2	0	3	1	1	1
<i>B.ovatus</i> (7)		1	0	0	1	2	0
<i>B.thetaiotaomicron</i> (6)		1	0	0	0	1	0
<i>B.distasonis</i> (6)		1	1	0	1	1	0
<i>P.melaninogenica</i> (8)		0	0	0	0	0	0
Diğer (6)		0	1	2	0	0	1
<b>Toplam (86)</b>		<b>8</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>

b) Klindamisine standart yöntem olarak kabul edilen AD ile duyarlı bulunan 4 suş ET ile dirençli, AD ile dirençli bulunan 5 suş ET ile duyarlı bulunmuştur. AD ile duyarlı bulunan 8 suş BDE ile dirençli, AD ile dirençli bulunan 3 suş BDE ile duyarlı; BDE ile duyarlı bulunan 5 suş ET ile dirençli, BDE ile dirençli bulunan 7 suş ise ET ile duyarlı bulunmuştur. *P.melaninogenica* suşları klindamisin için de üç yöntemle aynı sonucu vermiştir (Tablo 4).

Tablo 3. Üç yöntemle klindamisin için farklı sonuç veren suş sayıları ve türlere dağılımı.

Bakteri (n)	Du:	AD	ET	AD	BDE	BDE	ET
	Dİ:	ET	AD	BDE	AD	ET	BDE
<i>B.fragilis</i> (38)		2	2	3	1	4	2
<i>B.vulgatus</i> (15)		1	1	2	1	0	1
<i>B.ovatus</i> (7)		1	1	0	0	1	1
<i>B.thetaiotaomicron</i> (6)		0	0	2	0	0	2
<i>B.distasonis</i> (6)		0	0	1	0	0	1
<i>P.melaninogenica</i> (8)		0	0	0	0	0	0
Diğer (6)		0	1	0	1	0	0
<b>Toplam (86)</b>		<b>4</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>

## TARTIŞMA

Bu çalışmada 86 anaerob Gram negatif çomak suşunun sefoksitin ve klindamisine duyarlılıkları NCCLS'in standart agar dilüsyon yöntemi, E test ve buyyonda disk elüsyon yöntemi ile belirlenerek sonuçları karşılaştırılmıştır. Sefoksitin için alınan sonuçlarda AD ile ET arasında %15 (13/86), AD ile BDE arasında %20 (17/86), ET ile BDE arasında %16 (14/86) uyumsuzluk saptanmış; 64 suşta (% 74) üç yöntemle de aynı sonuç alınmıştır. Klindamisine yapılan deneylerde AD ile ET arasında %11 (9/83), AD ile BDE arasında %13 (11/86), ET ile BDE arasında ise %14 (12/83) uyumsuz sonuca rastlanmıştır, 66 suşta 3 yöntemle de ve 3 suşta denenen iki yöntemle aynı sonuç alınmıştır (%80). Sonuçlar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).

Rosenblatt ve Gustafson (12) E test ile agar dilüsyonu karşılaştırdıkları çalışmalarında E testin agar dilüsyona benzer sonuçlar verdiğini, agar dilüsyona alternatif bir deney olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada da yine E testin agar dilüsyonla uyumlu sonuçlar verdiği, özellikle beta-laktam antibiyotikler ve klindamisine için deneylerde Wilkins-Chalgren agar ve Brucella agar besiyerlerinin kullanılmasının uygun olduğu belirtilmiştir. Ayrıca E test için bakteri süspansiyonunun 0.5 No.lu McFarland tüpü bulanıklığı yerine 1 No.lu McFarland bulanıklığında olması ile ilgili çalışmalar varsa da, çoğunlukla çalışmalarda 0.5 No.lu McFarland tüpü bulanıklığında bakteri süspansiyonu önerilmektedir (1,2,13,15,17,20). Bu çalışmada da bakteri süspansiyonu 0.5 No.lu McFarland tüpüne göre ayarlanmıştır.

Duyarlılık deneylerinde siyah pigmentli Gram negatif bakteriler için hemin, vitamin K ve sistein monohidroklorür ilave edilmiş Brucella buyyon ve agar besiyerleri kullanımı önerilmektedir (9,11,12,13,1). Agar dilüsyon yöntemi ile E teste göre saptanan MİK değerleri arasında büyük bir fark olmadığı, ancak 1-2 dilüsyonluk fark olduğu belirtilmiştir (20). Bu çalışmada da uyumsuz suşların birçoğunda ancak 1-2 dilüsyonluk bir fark bulunmuştur.

Agar dilüsyon ve E test ile yapılan duyarlılık deneylerinde özellikle geç üreyen anaerob bakteriler için 24 saatlik inkübasyonun yeterli olmadığı, en ideal inkübasyon süresinin 48 saat olduğu bildirilmektedir (20). Çalışmamızda her iki yöntemle 24 saatlik inkübasyon yeterli bulunmamış, kesin sonuçlar 48 saat sonra okunmuştur.

Schieven ve arkadaşları (13) da E testin standart agar dilüsyon yöntemi ile iyi bir uyum gösterdiğini, özellikle Gram pozitif bakterilerde uyumun daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar ve birçok başka araştırmacı E testin disk diffüzyon gibi basit olarak tatbik edilebilecek bir yöntem olduğunu ve çabuk üreyen anaerob bakteriler için bir gecelik inkübasyondan sonra sonuçların değerlendirilebileceğini bildirmektedir (1,2,3,12,13,15).

Bu çalışmada buyyonda disk elüsyon yöntemi de kullanılmış ve yöntemin agar dilüsyon yöntemiyle uyumunun %80'lerin üzerinde olduğu belirlenmiştir (8). Çalışmamızda üç yöntemle sefoksitin için %74, klindamisine için %80 tam uyum elde edilmiştir.

Çalışma sonuçlarına göre üç yöntem arasında istatistiksel açıdan fark olmadığı, anaerob bakterilerin MİK değerlerinin belirlenmesi için basit fakat pahalı bir yöntem olan E testin agar dilüsyon yöntemi yerine kullanılabilmesi, bu iki yöntem kullanılmadığında, özellikle rutin çalışmalarda, buyyonda disk elüsyon yönteminin de kullanılabilmesi söylenebilir.

## KAYNAKLAR

- 1- Bolmström A: Susceptibility testing of anaerobes with E test, *Clin Infect Dis* 16: 367 (1993).

- 2- Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJC: Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria, *J Clin Microbiol* 29:2197 (1991).
- 3- Duerden BI: Role of the reference laboratory in susceptibility testing of anaerobes and a survey of isolates referred from laboratories in England and Wales during 1993-1994, *Clin Infect Dis* 20: S180 (1995).
- 4- Finegold SM, NCCLS Working Group on Anaerobic Susceptibility Testing: Susceptibility testing of anaerobic bacteria, *J Clin Microbiol* 26: 1253 (1988).
- 5- Goossens H, Ieven M, Vercauteren E, Weekt S, Glupczynski Y, Smeets T, Karlsson A, Bolmström A: Susceptibility testing of anaerobes with E-test, *7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Kongre Özet Kitabı s.83, No.430, Viyana (1995).
- 6- Gürler N, Töreci: Resistance to various chemotherapeutics of Bacteroides strains isolated from clinical specimens in Istanbul, *ANKEM Derg* 6: 431 (1992).
- 7- Gürler N, Töreci K: Anaerobic bacteria isolated from clinical specimens in Istanbul and their susceptibilities to chemotherapeutics, "D Adam, H Lode, E Rubinstein (eds): *Recent Advances in Chemotherapy*" kitabında s.792, Futuramed Publ, Münih (1992).
- 8- Jorgensen JH, Redding JS, Howell AW: Evaluation of broth disk elution methods for susceptibility testing of anaerobic bacteria with the newer beta-lactam antibiotics, *J Clin Microbiol* 23: 545 (1986).
- 9- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, 3.baskı, *Approved Standard M11-A3*, Vol 13, No.26, Villanova (1993).
- 10- Rodloff AC, Appelbaum PC, Zabransky RS: *Practical Anaerobic Bacteriology*, Cumitech 5A, Amer Soc Microbiol, Washington (1991).
- 11- Rosenblatt JE: Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, "V Lorian (ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*" kitabında s.120, Williams-Wilkins, Baltimore-London-Tokyo (1991).
- 12- Rosenblatt JE, Gustafson DR: Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria, *Diagn Microbiol Infect Dis* 22: 279 (1995).
- 13- Schieven BC, Mossey VE, Lannigan R, Hussain Z: Evaluation of susceptibility of anaerobic organisms by the E test and reference agar dilution method, *Clin Infect Dis* 20: S337 (1995).
- 14- Smith-Ohm M: Agar dilution MIC test for anaerobic bacteria, "HD Isenberg (ed): *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Vol.1" kitabında s.5-9-1, Amer Soc Microbiol, Washington (1994).
- 15- Szöke I, Nagy E: Evaluation of E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria, *7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Kongre Özet Kitabı s.83, No.429, Viyana (1995).
- 16- Wexler HM: Susceptibility testing of anaerobic bacteria: myth, magic, or method, *Clin Microbiol Rev* 4: 470 (1991).
- 17- Wexler HM: Susceptibility testing of anaerobic bacteria. The state of the art, *Clin Infect Dis* 16: S328 (1993).
- 18- Wexler HM, Doern GV: Susceptibility testing of anaerobic bacteria, "PR Murray, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Tenover (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 6.baskı" kitabında s.1350, ASM Press, Washington (1995).
- 19- Wexler HM, Molitoris E, Jashnian F, Finegold SM: Comparison of spiral gradient and conventional agar dilution for susceptibility testing of anaerobic bacteria, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1196 (1991).
- 20- Wüst J, Hardegger U: Comparison of the E test and a reference agar dilution method for susceptibility testing of anaerobic bacteria, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 1169 (1992).