

GENİŞLETİLMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ VARLIĞININ SAPTANMASINDA KULLANILAN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ*

Zeynep GÜLAY, Meral KÜÇÜKGÜVEN BİÇMEN, Nuran YULUĞ

ÖZET

Çalışmamızda, genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretiminin gösterilmesi amacıyla kullanılan beş farklı yöntem etkinlik açısından karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, GSBL ürettiği bilinen altı pozitif kontrol suşu ve SHV-1 ile TEM-1 üreten iki negatif kontrol suşu kullanılmıştır. GSBL varlığının gösterilmesi amacıyla uygulanan yöntemler ve kontrol suşları ile alınan pozitif sonuçlar şöyledir: 1- Çift disk sinerji testi (ÇDS) % 100; 2- Mikrodilüsyon yöntemi ile seftazidim ve sefotaksim MİK değerlerinin saptanması % 67; 3- Mikrodilüsyon testinde inokulum miktarının 5×10^5 'den 5×10^6 ve 5×10^7 'ye çıkarılması % 100; 4- Biyoyöntem ile enzim aktivitesinin değerlendirilmesi % 33; 5- Disk difüzyon testi % 83. Mikrodilüsyon ve disk difüzyon sonuçlarının değerlendirmesinde yeni NCCLS standartları gözönüne alınmıştır. Bunlar dışında 25 *Klebsiella pneumoniae* ve 50 *Escherichia coli* izolatının da GSBL üretimi aynı yöntemlerle araştırılmış ve ÇDS ile bu suşların 12'sinde (6 *K.pneumoniae*, 6 *E.coli*) GSBL varlığı saptanmıştır. Diğer yöntemlerle elde edilen veriler incelendiğinde, ÇDS ile en uyumlu sonuçların disk difüzyon testi ile alındığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, ÇDS yönteminin GSBL üretiminin taranması açısından etkinliğini koruduğu gözlenmiştir.

SUMMARY

Detection of extended spectrum beta-lactamase production by different methods.

In this study, the abilities of different laboratory methods to detect extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) producing microorganisms, were compared. The results of testing six ESBL positive and two ESBL negative (SHV-1 and TEM-1 producers) transconjugants were as follows (positive results given as percentages): 1- Double disk synergy (DDS) test 100 %; 2- Microdilution method for ceftazidime or cefotaxime MIC values 67 %; 3- Microdilution test with a higher inoculum 100 %; 4- A microbiological assay in which the activity in bacterial sonicates were detected 33 %; 5- Disk diffusion test 83 %. New NCCLS standards were followed in reporting disk diffusion and microdilution tests. ESBL production in a total of 75 clinical isolates (25 *K.pneumoniae* and 50 *E.coli*) were also investigated by the same methods. ESBL production was detected in 12 (6 *K.peumoniae* and 6 *E.coli*) by the DDS. The method which correlated best with the DDS was disk diffusion. In conclusion, DDS test is still useful as a screening test for ESBL production.

* 13. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresinde sunulmuştur (1-5 Haziran 1998, Antalya).

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir.

GİRİŞ

Plazmidlerle taşınan genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), seftaksim, seftazidim ve seftriakson gibi oksiiimino sefalosporinlere ve aztreonam gibi monobaktamlara direnç gelişimine neden olan enzimlerdir (1,6,11). Bunlar, başta *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşları olmak üzere *Enterobacteriaceae* üyelerinde yaygın olarak bulunmakta ve bu türlerle gelişen infeksiyonların sağaltımında sorun oluşturmaktadır (1,6).

Bakterilerin GSBL üretimi rutin antibiyotik duyarlılık testleri ile gözden kaçabilmektedir. Bunun sonucunda son National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) önerilerinde değişiklikler olmuştur. Bu önerilerde, genişletilmiş spektrumlu beta-laktam ajanların Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK)'lerinin 2 mg/L'ye eşit ve daha yüksek olması veya inhibisyon zon çaplarının aztreonam için 28 mm; seftazidim için 23 mm, seftaksim için 26 mm'den dar olmasının GSBL üretimi için uyarıcı olması gerektiği bildirilmektedir (9,10).

GSBL üretiminin gösterilmesi amacıyla değişik yöntemler uygulanabilmektedir. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılan çift disk sinerji yöntemidir (6,13). Ancak bu yöntemin duyarlılığı da enzimin substrat profiline, diskler arası mesafeye ve değerlendiricinin deneyimine göre değişebilmektedir (3,4,14). Dolayısıyla, genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz saptanmasında güvenilir ve standart bir yöntem arayışı sürmektedir. Bu nedenle çalışmamızda SHV tipi GSBL ürettiği bilinen altı pozitif kontrol suşu ile SHV-1 ve TEM-1 üreten iki negatif kontrol suşu kullanılarak GSBL saptanması için önerilen beş farklı yöntem [çift disk sinerji testi (ÇDS); mikrodilüsyon yöntemi ile seftazidim (CAZ) ve seftaksim (CTX) MİK değerlerinin saptanması, mikrodilüsyon yönteminin inokulum yoğunluğu 5×10^6 ve 5×10^7 cfu/ml'ye çıkarılarak yinelenmesi, disk difüzyon testi ile aztreonam (ATM), CAZ ve CTX inhibisyon alanı çapının belirlenmesi, biyoyöntem ile enzim aktivitesinin saptanması] ile değerlendirilmiştir. Disk difüzyon ve MİK sonuçlarının değerlendirilmesinde yeni NCCLS kriterleri dikkate alınmıştır. Ayrıca, klinik örneklerden izole edilmiş 25 *Klebsiella pneumoniae* ve 50 *Escherichia coli* suşunun GSBL üretimi de aynı yöntemlerle incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar: Çalışmaya, Edinburgh Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Kemoterapi Laboratuvarı'ndan sağlanan ikisi SHV-2, ikisi SHV-5, biri SHV-3 ve biri de SHV-7 tipi GSBL üreten 6 pozitif kontrol suşu ve TEM-1 ve SHV-1 üreten iki negatif kontrol suşu ile Ekim-Kasım 1997 arasında Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş ve hastane veya toplum kökenli ayırımı yapılmaksızın rastgele seçilmiş 25 *K.pneumoniae* ve 50 *E.coli* suşu alınmıştır.

Çift disk sinerji testi (ÇDS): Mueller Hinton agar (Oxoid) besiyeri yüzeyine McFarland 0.5 eşeline göre bulanıklığı ayarlanmış bakteri süspansiyonu yayıldıktan sonra, merkeze bir amoksisilin-klavulanik asit (AMC) diski (20/10 µg) (Oxoid) ve çevresine disk merkezleri arasındaki uzaklık 30 mm olacak şekilde CAZ, CTX ve ATM diskleri yerleştirilmiştir. Bir gece 37°C'de inkübasyondan sonra geniş spektrumlu beta-laktam diskleri çevresindeki inhibisyon alanının beta-laktamaz inhibitörü diskine doğru genişlemesi GSBL olumluluğu olarak değerlendirilmiştir (6). İnhibisyon zon çaplarının dar olduğu durumlarda diskler arası uzaklık azaltılarak modifiye ÇDS uygulanmıştır (4).

Mikrodilüsyon yöntemi ve inokulum artırılması: Sefotaksim ve seftazidim minimal

inhibitör konsantrasyonları NCCLS önerilerine uyularak mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmıştır (9). Aynı deneyler inokulum miktarı 5×10^6 ve 5×10^7 'ye çıkarılarak yinelenmiştir. İnokulumun 5×10^7 'ye çıkarıldığı deneyler ayrıca 2 µg/ml klavulanik asit varlığında da uygulanmıştır. Standart mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerlerinin ≥ 128 mg/L'ye yükselmesi ve klavulanik asit eklendiğinde bu değerin 8 kat azalması GSBL açısından olumlu kabul edilmiştir (7,12).

Disk difüzyon testi: İzolatların beta-laktam antibiyotiklere duyarlılığı standart disk difüzyon tekniği ile incelenmiştir (10).

Biyoyöntem ile enzim aktivitesinin incelenmesi: GSBL aktivitesinin incelenmesi amacıyla *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 suşu Mueller Hinton agar yüzeyine yayılarak CAZ ve CTX ile disk difüzyon testi uygulanmış ve diskler çevresinde oluşan inhibisyon alanının çapı ölçülmüştür. İkinci aşamada, benzer şekilde plaklar hazırlanarak besiyeri yüzeyine beklenen inhibisyon zonu kenarına gelecek şekilde dört steril disk yerleştirilmiş ve çalışmaya alınan suşlardan elde edilen sonikatlar diskler üzerine damlatılmıştır. Dördüncü disk üzerine sonikat ile birlikte son konsantrasyonu 2 µg olacak şekilde klavulanat da eklenmiştir. GSBL ile antibiyotik inaktivasyonu, inhibisyon zonu içerisinde indikatör suşun üremesi ve zonun klavulanat etkisiyle 4. disk etrafında tekrar genişlemesi ile değerlendirilmiştir.

Biyoyöntem ile enzim ekstratlarının hazırlanması: Bakterilerin nutrient agar yüzeyindeki kolonileri 1 ml 50 mM fosfat tamponu ile yıkılarak toplandıktan sonra bakteriler sonikatörde parçalanmıştır. Sonikat 4°C'de, 10,000 rpm'de 10 dk santrifüje edilerek beta-laktamazları içeren üst sıvı toplanmıştır (12).

İstatistiksel analiz: Değişik yöntemlerin kontrol suşlarında GSBL saptama etkinliği SPSS programında Mc Nemar ve varyans analizi testleri ile; kontrol ve klinik suşlarda diğer yöntemlerin ÇDS ile uyumluluğu ise yine aynı programda kappa değerleri bulunarak incelenmiştir.

BULGULAR

ÇDS testi ile pozitif kontrol suşlarının tümünde, mikrodilüsyon yöntemi ile 4/6'sında (% 67), mikrodilüsyon yönteminde inokulum artırılması ile tümünde, biyoyöntem ile 2/6'sında (% 33), disk difüzyon testi ile 5/6'sında (% 83) GSBL varlığı saptanmıştır (Tablo 1 ve Tablo 2). Biyoyöntem ile GSBL saptama etkinliğinin ÇDS'ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). İnokulum miktarı artırılarak mikrodilüsyon testlerinin uygulanması ve değerlendirilmesinin zor olduğu, ayrıca bu yöntemle negatif kontrol suşları ile yanlış pozitif sonuçlar alınabildiği görülmüştür (Tablo 2). Diğer yöntemlerle yanlış pozitiflik saptanmamıştır.

Klinik suşlarla yapılan deneylerde ise ÇDS ile 6'sı *K.pneumoniae* ve 6'sı *E.coli* olmak üzere toplam 12 suşa GSBL üretimi belirlenmiştir. Disk difüzyon ile bu suşların % 75'inde, standart mikrodilüsyon ile % 50'sinde, biyoyöntem ile de % 42'sinde sonuçlar GSBL yönünden olumlu bulunmuştur (Tablo 3). Mikrodilüsyon yönteminde inokulum artırılması ile MİK değerlerinin 128 mg/L üzerine çıkması değerlendirildiğinde, bu suşların 10/12'si (% 83) yanısıra, diğer yöntemlerle GSBL varlığı saptanmayan 6 suşta daha pozitiflik saptanmıştır. Bunlardan ikisinde beta-laktam MİK/beta-laktam+klav MİK oranı < 8 olduğu için sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir. Sayılan yöntemler arasında ÇDS ile en uyumlu sonuçların standart disk difüzyon testi ile alındığı gözlenmiştir (Kappa=0.7).

Tablo 1. Kontrol suşlarında çeşitli yöntemlerle GSBL gösterilmesi.

Enzim tipi	Disk difüzyonda inhibisyon alanı çapı (mm)			Mikrodifüzyon MIK (µg/ml)			ÇDS	Biyoyöntem	
	ATM	CTX	CAZ	Sonuç	CAZ	CTX			Sonuç
(+) kontrol									
SHV-2	35	35	35	-	0.25	1	+	+	
SHV-2	28	25	30	+	0.25	2	+	-	
SHV-3	29	24	28	+	0.50	4	+	-	
SHV-5	15	18	14	+	256	8	+	+	
SHV-5	20	18	18	+	128	8	+	-	
SHV-7	14	22	20	+	4	0.25	+	-	
(-) kontrol									
SHV-1	35	36	36	-	0.25	2	-	-	
TEM-1	30	30	35	-	0.25	0.25	-	-	

Tablo 2. İnokulum arttırılmasının etkisi.

Enzim tipi	CAZ MIK ($\mu\text{g/ml}$)				Sonuç	CTX MIK ($\mu\text{g/ml}$)				Sonuç
	5×10^5	5×10^6	5×10^7	$5 \times 10^5 + \text{klav}$		5×10^5	5×10^6	5×10^7	$5 \times 10^5 + \text{klav}$	
(+) kontrol										
SHV-2	0.25	1	64	<0.25	-	1	64	256	1	+
SHV-2	0.25	4	128	0.25	+	2	128	>256	0.50	+
SHV-3	0.50	2	16	4	-	4	32	256	0.50	+
SHV-5	256	>256	>256	1	+	8	128	256	0.50	+
SHV-5	128	>256	>256	1	+	8	128	256	2	+
SHV-7	4	4	128	4	+	0.25	128	256	0.50	+
(-) kontrol										
SHV-1	0.25	1	64	8	\pm	2	32	128	0.50	+
TEM-1	0.25	1	128	1	+	0.25	0.25	0.25	0.25	-

Tablo 3. Değişik yöntemler kullanılarak kontrol suşları ve klinik suşlarda GSBL varlığının saptanma oranları.

Yöntem	GSBL saptama etkinliği	
	Kontrol suşları (6)	Klinik suşlar (12)*
Çift disk sinerji	6/6	12/12
Mikrodilüsyon		
CAZ	3/6	6/12
CTX	4/6	3/12
CAZ+CTX	5/6	6/12
Disk difüzyon		
CAZ	3/6	6/12
CTX	5/6	6/12
ATM	5/6	9/12
CAZ+CTX+ATM	5/6	9/12
Inokulum artırılması		
5×10^6	4/6	5/12
5×10^7	6/6	12/12
Biyoyöntem	2/6	5/12

* ÇDS ile pozitif bulunan suşlar alınmıştır.

Ayrıca ÇDS testi negatif olan klinik suşların geniş spektrumlu beta-laktam ajanlarla elde edilen disk difüzyon ve değişen inokulum miktarları kullanılarak mikrodilüsyon test sonuçları incelendiğinde bunların GSBL pozitif olan izolatlarla kıyasla anlamlı olarak farklı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$, Tablo 4).

Tablo 4. ÇDS sonucu negatif olan klinik suşların geniş spektrumlu beta-laktam ajanlarla test sonuçları.

Tür (Sayı)	Disk difüzyon çapı (mm)*			MIK ₅₀			
	ATM	CAZ	CTX	CAZ		CTX	
				5×10^5	5×10^7	5×10^5	5×10^7
E.coli (44)	34.8	31.5	32	0.25	8	0.25	4
K. pneumoniae (19)	33.3	30.4	31.8	0.25	4	0.25	1

* Ortalama çap.

TARTIŞMA

Enterobacteriaceae üyelerinde GSBL varlığının saptanması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (5,6,7,9,10). Ancak, standart ve güvenilir bir yöntem arayışı sürmektedir. Standart disk difüzyon ve mikrodilüsyon testleri ile GSBL saptanmasında sorunlar bulunmak-

tadır. Yeni NCCLS kriterlerinin uygulanması ile bu durum kısmen düzelmekle birlikte, farklı GSBL tipleri için optimal substrat profillerinin değişmesi nedeniyle tek bir beta-laktam ajanla rutin test uygulanması bu enzimleri saptama açısından yetersiz kalmaktadır (2,5). Bu açıdan seftodoksimin tümit verici olduğu bildirilmektedir (2,8). Jacoby ve Han (5)'in çalışmasında, GSBL üretiminin gösterilmesi için standart 30 µg'lık disk yerine 5 µg'lık seftazidim diski kullanılmasını önermiştir. Emery ve Weymouth (3), eski NCCLS standartlarına göre seftazidim direnci kriter olarak alındığında, çift disk sinerji testi ile GSBL saptanan izolatların ancak % 39'unda pozitiflik belirlenebildiğini göstermişlerdir. Coudron ve ark (2), çift disk sinerji testi ile GSBL varlığı gösterilen *Enterobacteriaceae* ailesinden 84 izolatın 83'ünde izoelektrik odaklama yöntemi ile de enzim varlığının saptandığı bildirilmektedir. Aynı araştırmacılar GSBL üreten 58 izolat kullanarak GSBL saptamak için uygulanan çeşitli yöntemleri kıyasladıklarında, enzim varlığının çift disk sinerji testi ile % 79 (seftazidim diski ile) - % 95 (aztreonam diski ile) oranında, seftazidim ve seftotaksim MİK değerlerinin incelenmesi ile sırası ile % 86 ve % 91 oranında, standart disk difüzyon testi ile de % 78 (aztreonam) - % 98 (seftazidim) oranında gösterilebildiğini belirlemişlerdir. Çalışmamızda da, GSBL üretiminin saptanması açısından önerilen ve rutin laboratuvarlarda uygulanabilen çeşitli yöntemler incelenmiştir. Kontrol suşları ile alınan sonuçlara bakıldığında, izoelektrik odaklama ve sekans tayini ile saptanmış olan enzimler ile ilgili uyumlu verilerin ÇDS ile elde edildiği, bunu yeni NCCLS kriterleri ile değerlendirilen disk difüzyon testinin izlediği gösterilmiştir. Mikrodilüsyon yönteminde inokulum miktarlarının artırılması ile de pozitif kontrol suşlarının tümünde GSBL varlığı belirlenmesine rağmen negatif kontrol suşları ile yanlış pozitif sonuçlar alınması ve gerek uygulama, gerekse değerlendirmenin zor olması bu testin dezavantajları olarak gözlenmiştir. Klinik suşlar ile elde edilen sonuçlar da genel olarak kontrol suşları ile alınanlara benzerdir. Mikrodilüsyon yöntemi ile çift disk sinerji testi enzim aktivitesi bulunan suşlara ek olarak dört suşda daha pozitiflik saptanmıştır. Ancak bu yöntemin özgülüğü düşük olabileceği için pozitif sonuçların izoelektrik odaklama gibi daha ileri yöntemlerle doğrulanması gerektiği düşünülmüştür.

Sonuç olarak ÇDS yönteminin GSBL üretiminin aranması açısından etkinliğini koruduğu gösterilmiştir. Yeni NCCLS değerlendirme kriterlerinin uygulanması ve çeşitli geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotik disklerinin kullanılması koşulu ile disk difüzyon testinin de bu açıdan yol gösterici olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

- 1- Bush K: Is it important to identify extended spectrum beta-lactamase producing isolates, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 361 (1996).
- 2- Coudron PE, Moland ES, Sander CC: Occurrence and detection of extended spectrum β-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae at a Veterans Medical Center; seek and you may find, *J Clin Microbiol* 35: 2593 (1997).
- 3- Emery CL, Weymouth LA: Detection and clinical significance of extended-spectrum β-lactamases in a tertiary-care medical center, *J Clin Microbiol* 35: 2061 (1997).
- 4- Gülay Z, Abacıoğlu H, Yuluğ N: Çift disk sinerji yönteminde diskler arası uzaklığın sonuca etkisi, *İnfeksiyon Derg* 9: 89 (1995).
- 5- Jacoby GA, Han P: Detection of extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol* 34: 908 (1996).

- 6- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A: Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns, *Rev Infect Dis* 10: 867 (1988).
- 7- Jett BD, Ritchie DJ, Reichley R, Bailey TC, Sahn D: In vitro activities of various β -lactam agents against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. resistant to oxyiminocephalosporins, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1187 (1995).
- 8- Katsanis GP, Spargo J, Ferraro MJ, Sutton L, Jacoby GA: Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases, *J Clin Microbiol* 32: 691 (1994).
- 9- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 4th ed, Approved Standard M7-A4 (M100-37), NCCLS, Wayne Pa (1997).
- 10- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 6th ed, Approved Standard M2-A6 (M 100-57), NCCLS, Wayne Pa (1997).
- 11- Philippon A, Labia R, Jacoby G: Extended spectrum beta-lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1131 (1993).
- 12- Shanahan P, Thomson CJ, Amyes SGB: Beta-lactam resistance in aerobic commensal faecal flora, *Int J Antimicrob Agents* 2: 81 (1993).
- 13- Sirot S: Detection of extended spectrum plasmid mediated beta-lactamases by disk diffusion, *Clin Microbiol Infect* 2 (Suppl 1): S35 (1996).
- 14- Thomson KS, Sanders CC: Detection of extended spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional test, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1877 (1992).