

## **E TEST: YENİ BİR ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTİNİN DİSK DİFÜZYON YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**Sercan ULUSOY<sup>1</sup>, Bilgin ARDA<sup>1</sup>, Öner ÖZER<sup>2</sup>, Banu ÇETİN<sup>1</sup>,  
Mehmet Ali ÖZİNEL<sup>2</sup>**

### **ÖZET**

Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 100 Gram negatif bakteri suşunun 11 değişik antimikrobiyale in-vitro duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ve E Test ile ayrı ayrı belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemi referans kabul edilerek değişik antimikrobiyaller için E Test'in duyarlılığının % 88-100, özgülüğünün % 87-100, uyumluluğunun % 92-100 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Yüz bakteri suşu ve 11 antimikrobiyal ile yapılan toplam 1100 test için E Test'in disk difüzyon yöntemine göre duyarlılığı, özgülüğü ve uyumluluğu ortalaması sırasıyla % 98, % 94 ve % 96 olarak bulunmuştur.

### **SUMMARY**

*E Test: A novel antimicrobial susceptibility test and its comparison with disk diffusion method.*

In-vitro susceptibilities of 100 Gram negative bacterial strains isolated from various clinical specimens against 11 different antimicrobial agents were investigated by using, disk diffusion method and E Test.

It was determined that the sensitivity, specificity and consistency of E Test in comparison with disk-diffusion method were ranged 88-100 %, 87-100 %, 92-100 %, respectively.

For overall 100 bacterial strains, 11 antimicrobial agents and 1100 tests, the sensitivity, specificity and consistency of E Test in comparison with disk diffusion method were found to be 98 %, 94 %, 96 %, respectively.

### **GİRİŞ**

Antimikrobiyal duyarlılık testleri değişik yöntemler ile yapılabilir. En sık kullanılan yöntemler ilk olarak Bauer ve ark. tarafından tanımlanan ve daha sonra National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) tarafından modifiye edilen disk difüzyon yöntemi, NCCLS tarafından tanımlanan buyyonda mikrodilüsyon yöntemi, Ericsson ve Sherris tarafından tanımlanıp NCCLS tarafından standardize edilen agar dilüsyon yöntemi ve son yıllarda geliştirilen otomatize ve mekanize duyarlılık testi yöntemleridir (1).

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1- Klinik Bakteriyojoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, 2- Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.

E Test; minimal inhibisyon konsantrasyonlarını (MİK) saptayabilen ve agar difüzyon yönteminin kolaylığını da taşıyan yeni bir in-vitro antimikrobiyal duyarlılık testidir (1, 5).

Disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemlerinin bir modifikasyonu olan E test; bir yüzünde bir ucundan diğer ucuna doğru giderek azalan miktarlarda antimikrobiyal içeren su geçirmez plastik bir şerittir (1, 5, 7). Bu şerit denenecek mikroorganizmanın ekildiği agar plaklarına yerleştirilir. İnkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zonunun şerit ile kesiştiği noktada yazılı olan değer minimal inhibisyon konsantrasyonunu gösterir (1, 7).

Bu çalışmada; uygulanması açısından disk difüzyon yöntemi kadar kolay, MİK değerlerini göstermesi açısından bu yöntemden daha üstün olarak görünen E Test'in, disk difüzyon yöntemine göre duyarlılık, özgüllük ve uyumluluğunun araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri suşları: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Laboratuvarında klinik örneklerden soyutlanan 100 Gram negatif bakteri (23 *Escherichia coli*, 32 *Klebsiella pneumoniae*, 21 *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *Pseudomonas paucimobilis*, 2 *Pseudomonas cepacia*, 15 *Acinetobacter baumannii*, 3 *Acinetobacter spp.*, 1 *Proteus mirabilis*, 1 *Salmonella typhi*, 1 *Salmonella paratyphi A*) suşu denenmiştir.

*Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşları kontrol olarak kullanılmıştır.

Antimikrobiyal duyarlılık testi: 100 Gram negatif bakteri suşunun 11 değişik antimikrobiyale (amoksisilin/klavulanat, sefuroksim, sefotaksim, seftriaksim, seftazidim, aztreonam, imipenem, siprofloksasin, gentamisin, amikasin, piperasilin) duyarlılıkları modifiye Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır (8).

E Test: Aynı suşların aynı antimikrobiyalleri içeren E Test şeritleri (AB Biodisk) ile Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyerinde duyarlılıkları araştırılmış ve minimal inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir.

Bu işlem için 15 cm çapındaki petri kutularına 4.5mm kalınlığında hazırlanan MHA besiyerlerine her bir bakteri kökeninin 18 saatlik sıvı kültüründen hazırlanan bakteri süspansiyonlarından (0.5 McFarland:  $10^8$  cfu/ml) eküvyonla yüzey ekimi yapılmıştır. Bu plakların her birine en fazla 6 adet değişik antimikrobiyal içeren E Test şeritleri yerleştirilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra her bakteri kökeni için 11 antimikrobiyalin MİK değerleri saptanmış ve bu değerlere göre duyarlılıkları belirlenmiştir.

Sonuçların değerlendirilmesi: Disk difüzyon yöntemi referans olarak kabul edilmiştir (8). E Test ile saptanan MİK değerlerine göre bakteri suşlarının duyarlılıklarının belirlenmesinde NCCLS kriterleri göz önüne alınmıştır (9). E Test ile duyarlılık belirlemede göz önüne alınan NCCLS kriterleri tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. NCCLS'e göre duyarlılık belirlemede göz önüne alınan MKK değerleri (mcg/ml).

Antimikrobiyal	S	I	R
Amoksisilin/klavulanat	< 8/4	16/8	> 32/16
Sefuroksim	< 4	8-16	> 32
Sefotaksim	< 8	16-32	> 64
Seftriakson	< 8	16-32	> 64
Seftazidim	< 8	16	> 32
Aztreonam	< 8	16	> 32
İmipenem	< 4	8	> 16
Siprofloksasin	< 1	2	> 4
Gentamisin	< 4	—	> 16
Amikasin	< 16	—	> 64
Piperasilin			
Pseudomonas	< 64	—	> 128
Diğer Gram negatif bakteriler	< 16	32-64	> 128

S: Duyarlı, I: Orta derecede duyarlı, R: Dirençli.

E Test'in disk difüzyon yöntemine göre duyarlılık, özgüllük ve uyumluluğunun belirlenmesinde kullanılan istatistiksel hesaplar kaynak (4)'e göre yapılmıştır.

## BULGULAR

E Test'in difüzyon yöntemine göre duyarlılık, özgüllük ve uyumluluk oranları her antimikrobiyal için ayrı olarak tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. E Test'in her antimikrobiyal için disk difüzyon yöntemine göre belirlenen duyarlılık, özgüllük ve uyumluluk oranları (%).

Antimikrobiyal	Duyarlılık	Özgüllük	Uyumluluk
Amoksisilin/klavulanat	94	100	98
Sefuroksim	100	97	96
Sefotaksim	100	90	93
Seftriakson	95	91	96
Seftazidim	100	87	92
Aztreonam	92	97	96
İmipenem	100	100	100
Siprofloksasin	100	95	98
Gentamisin	100	91	96
Amikasin	100	90	92
Piperasilin	88	97	94

Yüz Gram negatif bakteri suşu için 11 antimikrobiyal ile yapılan toplam 1100 test göz önüne alındığında E Test'in disk difüzyon yöntemine göre duyarlılık, özgüllük ve uyumluluk oranları ortalaması sırasıyla % 98, % 94 ve % 96 olarak bulunmuştur.

## TARTIŞMA

E Test, teknik açıdan agar dilüsyon ve sıvı dilüsyon yöntemlerine oranla uygulanması çok daha kolay, özel araç ve gereç gerektirmeyen bir antimikrobiyal duyarlılık testidir (5). Bu testin en büyük avantajları disk difüzyon yönteminde olduğu gibi kolay uygulanması, ayrıca dilüsyon yöntemlerinde olduğu gibi minimal inhibisyon konsantrasyonlarını da belirleyebilmesidir (1, 5, 7).

Bu çalışmalarda, henüz rutin kullanıma girmeyen E Test'in günümüzde rutin antimikrobiyal duyarlılık testlerinin başında gelen disk difüzyon yöntemine göre duyarlılık, özgüllük ve uyumluluğunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tablo 2'de görüldüğü gibi E Test'in disk difüzyon yöntemine göre duyarlılığı değişik antimikrobiyaller için % 88 ile % 100 arasında bulunmuştur. 11 antimikrobiyalin 7'si için bu oran % 100'dür. Özgüllük ise, % 87 ile % 100 arasında değişmektedir. Bu iki testin uyumluluğu incelendiğinde değişik antimikrobiyaller için % 92 ile % 100 arasında değiştiği görülmektedir.

İncelenen 100 bakteri suşu ve 11 antimikrobiyal göz önüne alındığında toplam 1100 test yapılmıştır. 1100 testin duyarlılık, özgüllük ve uyumluluk oranları ortalaması sırasıyla % 98, % 94 ve % 96 olarak belirlenmiştir.

Görüldüğü gibi E Test'in disk difüzyon yöntemine göre gerek duyarlılık gerekse özgüllük ve uyumluluğu son derece yüksektir.

E Test'in standart duyarlılık testleri ile karşılaştırılması amacı ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Stafilokoklar, Gram negatif aerop çomaklar, anaeroplara, hatta *Helicobacter pylori* için değişik antimikrobiyaller ile son derece doğru ve uyumlu MİK değerleri saptandığını bildiren yayınlar vardır (1, 2, 3).

Jorgensen ve ark. (6) *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae* gibi zor üreyen mikroorganizmalarda ampisilin ve trimetoprim-sulfametoksazol gibi bazı antimikrobiyallere duyarlılığın E Test ile araştırılmasında bazı sorunların ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Ancak, daha sonraları yapılan çalışmalarda böyle bir sorunun olmadığı, özellikle pnömokoklarda penisilin dahil bir çok antimikrobiyale karşı çok uyumlu MİK sonuçları saptandığı bildirilmiştir (5).

Huang ve ark (5) E Test ile saptanan MİK değerlerini, agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırdıklarında stafilokoklarda % 97.3, Gram negatif çomaklarda % 94.6, enterokoklarda ise % 100 oranında uyum belirlemişlerdir.

Baker ve ark (1) E Test'i disk difüzyon, agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile karşılaştırmışlar, E Test'in disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile % 95.1, agar dilüsyon yöntemi ile % 95.2 oranında uyumlu olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada 195 Gram pozitif ve Gram negatif bakteri suşu ile 14 değişik antimikrobiyal incelenmiş ve E Test ile elde edilen sonuçların tüm standart antimikrobiyal duyarlılık testleri ile saptanan sonuçlara göre son derece doğru ve güvenilir olduğu ileri sürülmüştür.

Çalışmamızda E Test ile disk difüzyon yöntemi arasında belirlenen yüksek duyarlılık, özgüllük ve uyumluluk oranları nedeni ile bu yeni duyarlılık testinin oldukça güvenilir bir test olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle MİK'un belirlenebilmesi bu testin kolaylığı yanında en büyük avantajıdır. Buna karşılık

fiyatının çok yüksek oluşu en önemli dezavantajdır (1 şerit: 2.25 Amerikan Doları). Bu nedenle özellikle gelişmekte olan ülkelerde rutin kullanıma girmesi zordur. Ancak, MİK saptanması gereken durumlarda ve özellikle güç üreyen mikroorganizmaların duyarlılık testlerinde karşılaşılan sorunların çözümünde yararlı olabilecek bir yöntemdir.

#### KAYNAKLAR

1. Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C: Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria, *J Clin Microbiol* 29: 533 (1991).
2. Brown DF, Brown L: Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity, *J Antimicrob Chemother* 27: 185 (1991).
3. 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).
4. Dawson SB, Trapp GT: *Basic and Clinical Biostatistics*, 4. baskı, Appleton and Lange, Norwalk (1990).
5. Huang MB, Baker CN, Banerjee S, Tenover FC: Accuracy of the E Test for determining antimicrobial susceptibilities of staphylococci, enterococci, *Campylobacter jejuni* and Gram-negative bacteria resistant to antimicrobial agents, *J Clin Microbiol* 30: 3243 (1992).
6. Jorgensen JH, Howell AW, Maher LA: Quantative antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* by using the E Test, *J Clin Microbiol* 29: 109 (1991).
7. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC: *Diagnostic Microbiology*, 4. baskı, JB Lippincott Company, Philadelphia (1992).
8. NCCLS: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test*, 5. baskı, Document M2-A5, Villanova (1993).
9. NCCLS: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 2. baskı, Document M7-A2, Villanova (1990).