

ACINETOBACTER BAUMANNII VE PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARINDA KARBAPENEM DUYARLILIĞINDA DİSK DİFÜZYON TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF DISK DIFFUSION TEST FOR CARBAPENEM SENSITIVITY IN *ACINETOBACTER BAUMANNII* AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS

Özay ARIKAN AKAN*, Sevil UYSAL*

ÖZET: Bu çalışma, hastanemizde rutin disk difüzyon testi (DD) yapılırken meropenem dirençli *Acinetobacter* türlerinin E-test kullanılarak doğrulanması sırasında bazı suşlarda uyumsuzluk görülmesi sonucunda, DD'nin fermenter olmayan basillerde karbapenem duyarlılık durumunu tespitteki başarısını sorgulamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Rutin haftalık antibiyotik duyarlılık testi kalite kontrol çalışmalarının yapıldığı klinik mikrobiyoloji laboratuvarımızda izole edilmiş olan 157 *Acinetobacter baumannii* ve 157 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun karbapenem (imipenem ve meropenem) duyarlılığı DD testinin yanı sıra E-test ile değerlendirilmiştir. Meropenem için *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* suşlarında DD ile E-test arasındaki uyumsuzluk oranı sırasıyla %10.8 ve %4.5 olarak bulunmuştur. Her iki grup bakteride de uyumsuzluk MİK değerleri ve disk difüzyon çapları göz önüne alındığında anlamlı farklılık şeklindedir. İmipenemde ise *A.baumannii*'de uyumsuzluk saptanmazken, *P.aeruginosa*'da %5.1 oranında uyumsuzluk tespit edilmişse de, MİK değerlerinin orta düzey direnci göstermesi ve disk difüzyon çaplarının alt sınıra yakın olması, bu farklılığın teknik açıdan tekrarlanabilirliğinin düşük olduğunu düşündürmektedir. DD testi ile karbapenem duyarlılığının bakıldığı rutin laboratuvarlarda özellikle meropenem direnci tespit edildiğinde, farklı bir yöntem ile doğrulanması hem hasta sonuçları hem de epidemiyolojik veriler açısından önemlidir. Rutin antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanması sırasında her laboratuvar kendi koşulları içerisinde kontrol çalışmaları yapmalıdır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiyotik duyarlılık, disk difüzyon, E-test.

ABSTRACT: This study was conducted upon the detection of discordant results obtained for *Acinetobacter* species against meropenem by disk diffusion susceptibility and E-test method. The aim of this study was to investigate the reliability of disk diffusion method for the determination of carbapenem susceptibility in non-fermentative bacilli. Carbapenem (imipenem and meropenem) sensitivities of 157 *Acinetobacter baumannii* and 157 *Pseudomonas aeruginosa* strains were performed by disk diffusion test and E-test in our laboratory

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarları, Ankara.

where quality control of antibiotic susceptibility tests are performed weekly. For meropenem, discordance of the two tests were 10.8% and 4.5% for *A.baumannii* and *P.aeruginosa*, respectively. MIC values and disk diffusion zone diameters were significantly different from each other. There was no difference in terms of imipenem in *A.baumannii* strains but 5.1% of *P.aeruginosa* isolates showed discordance. Since, for the *P.aeruginosa* isolates with discordant imipenem susceptibility results, the imipenem disk diffusion zones were close to the lower level and their MIC values were within the intermediate resistance range, it was assumed that this technical discordance had low risk of reproducibility. In routine laboratories, meropenem resistance detected by disk diffusion method, should be verified by another technique. This is not only important for patient results but for epidemiological data as well. Routine quality control studies for antibiotic susceptibility tests and close observation of suspicious results, is mandatory for each laboratory, in order to achieve good quality performance.

Key words: Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, antibiotic susceptibility, disk diffusion, E-test.

G İ R İ Ő

Rutin uygulamaların gerekleŖtięi klinik laboratuvarlarda en nemli konulardan biri "standardizasyon"dur. Antibiyotik duyarlılık testlerinin standardizasyonu, hem hastaların tedavisinin yönlendirilmesi hem de epidemiyolojik verilerin oluŖturulması açısından ayrıca önem taŖır. Antibiyogramların standardizasyonu amacıyla tüm dünyada deęiŖik ülkelerde titizlikle hazırlanan kurallar benimsenmiŖ ve kullanılmaktadır¹⁻³. Bu standartların ülke genelinde doğru olarak uygulanması, kıyaslanabilir verilerin elde edilmesi için çok önemlidir. Bu kurallar uygulanırsa bile tüm dünyada geliŖen yeni direnç mekanizmaları ile zaman zaman yeterlilikleri tartıŖılmakta veya standardize edilmiŖ konularda dahi rutin uygulamalar sırasında sapmalar gözlenebilmekte ve tüm standartlar zaman zaman gözden geirilmektedir^{4,5}.

Bu alıŖma, hastanemizde rutin disk difüzyon testi (DD) uygulaması esnasında meropenem dirençli *Acinetobacter* türlerinin E-test kullanılarak doğrulanması sırasında bazı suŖlarda uyumsuzluk görülmesi sonucunda, DD'nin nonfermenter basillerde karbapenem duyarlılık durumunu tespitteki baŖarısını sorgulamak amacıyla yapılmıŖtır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji nitesinde 2002-2004 yılları arası, farklı dönemlerde farklı hastalara ait izole edilmiŖ ve Mini-api (bio-Merieux) sistemi kullanılarak tanımlanmıŖ 157 *Acinetobacter baumannii* ve 157 *Pseudomonas aeruginosa* suŖu alıŖmaya alındı. Gram negatif bakteriler için *E.coli* ATCC 25922 suŖu kullanarak haftalık disk difüzyon (DD) kalite kontrolü yapılan laboratuvarımızda, rutin laboratuvar alıŖmaları sırasında DD testi ile karbapenem duyarlılığı bakılan izolatlarda, eŖ zamanlı olarak E-test ile imipenem ve karbapenem MİK değerlerine bakıldı ve sonuçlar kıyaslandı.

Disk difüzyon testi: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS-yeni adıyla CLSI -The Clinical and Laboratory Standards Institute) önerilerine uygun olarak, Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerinde 0.5 McFarland'a ayarlanmış bakteri süspansiyonu ile imipenem (Oxoid-10mcg) ve meropenem (Oxoid-10 mcg) diskleri kullanılarak uygulandı⁶. Ekimler 35°C de bir gece inkübasyondan sonra değerlendirildi. Zon çapları her iki antibiyotik için ≤ 13 mm ise dirençli (R), 14-15 mm ise orta dirençli (I), ≥ 16 mm ise duyarlı (S) olarak kabul edildi.

E-test: Bu amaçla MHA besiyeri kullanıldı ve sonuçlar üretici firmanın önerileri doğrultusunda 35°C de 48 saat inkübasyondan sonra değerlendirildi. Her iki antibiyotik için MİK değerleri ≤ 4 mcg/ml ise dirençli (R), ≥ 16 mcg/ml ise duyarlı (S) ve aradaki dilüsyonlar orta dirençli olarak kabul edildi.

B U L G U L A R

İmipenem için *A.baumannii*'de E-test ve DD testleri arasında uyumsuzluk gözlenmezken, *P.aeruginosa*'da DD ile duyarlı olarak bulunan 8 izolat E-test ile dirençli olarak tanımlanmıştır (uyumsuzluk oranı %5.1). Meropenem için uyumsuz test oranı *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* için sırasıyla %10.8 ve %4.5 olarak bulunmuştur. Bu uyumsuzluk oranları DD testinde yalancı direnç şeklindedir (Tablo I). *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* suşlarında DD testinin antibiyotiklere göre duyarlılık ve özgüllük durumları ile belirleyici değerleri Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo I: Çalışılan Antibiyotikler İçin E-test ve Disk Difüzyon Testlerinin Uyumu

İmipenem	E-Test ile	Disk Difüzyon Testi ile	
		Dirençli*	Duyarlı
<i>A.baumannii</i> (n: 157)	Dirençli*	79	0
<i>A.baumannii</i> (n: 157)	Duyarlı	0	78
<i>P.aeruginosa</i> (n: 157)	Dirençli	28	8
<i>P.aeruginosa</i> (n: 157)	Duyarlı		121
Meropenem			
<i>A.baumannii</i> (n: 157)	Dirençli	76	0
<i>A.baumannii</i> (n: 157)	Duyarlı	17	64
<i>P.aeruginosa</i> (n: 157)	Dirençli	25	0
<i>P.aeruginosa</i> (n: 157)	Duyarlı	7	125

* Dirençli (R) ve "intermediate" (I) suşları içermektedir.

Tablo II: Disk Difüzyon Testinin Antibiyotiklere ve Bakterilere Göre Duyarlılık ve Özgüllük Değerleri

	Duyarlılık %	Özgüllük %	PPV* %	NPV* %
İmipenem				
<i>A.baumannii</i>	100	100	100	100
<i>P.aeruginosa</i>	77	100	100	93.7
Meropenem				
<i>A.baumannii</i>	100	84.2	86.5	100
<i>P.aeruginosa</i>	78	94	78	100

*PPV: Pozitif prediktif değer, NPV: Negatif prediktif değer.

Tablo III: Meropenem İçin Uyumsuzluk Saptanan
A.baumannii Suşlarının Değerleri

Suş No.	MİK Değeri (mcg/ml)	DD Çapı (cm)
1	3	*
74	3	*
75	3	*
77	3	*
83	1.5	*
84	3	12
87	1	14 (I)**
91	1.5	14 (I)
92	1.5	*
94	1	14 (I)
95	0.75	13
110	1.5	13
114	0.5	14 (I)
126	1.5	12
127	0.75	*
130	0.75	13
137	0.5	15 (I)

* Zon içi üremelerle dirençli kabul edilmiştir.

** I: Orta dirençli.

Tablo IV: Meropenem ve İmipenem İçin Uyumsuzluk Saptanan
P.aeruginosa Suşlarının Değerleri

Meropenem için		
Suş No.	MİK değeri (mcg/ml)	DD çapı (cm)
29	4	14
100	1	9
127	0.0064	*
128	0.25	*
144	0.5	0
153	1.5	0
155	0.5	0
İmipenem için		
Suş No.	MİK değeri (mcg/ml)	DD çapı (cm)
29	8 (I)**	18
31	6 (I)	16
125	8 (I)	18
130	12 (I)	16
131	8 (I)	16
133	8 (I)	16
149	8 (I)	19
154	8 (I)	20

* Zon içi üremelerle dirençli kabul edilmiştir.

** I: Orta dirençli.

T A R T I Ş M A

Klinik laboratuvarların verdiği antibiyotik duyarlılık sonuçları antibiyotik kullanım politikalarını yönlendirmesi ve hasta hayatı açısından çok önemlidir. Bunların belirli standartlara uygun olarak yapılması gerekmektedir. Ülkemiz genelinde kabul edilmiş olan standartlar CLSI standartları olup, kendi içerisinde yenilenen aralıklarla düzeltmeler sağlanmaktadır. Geliştirilmiş hiç bir standart günümüzde tek başına yeterli olmadığı için, eksikliklerin yakın takibi ve gerekli ek testlerin laboratuvarlarda uygulanması doğruya yaklaşmayı sağlar. Belirli konularda laboratuvarların kendi deneyimleri ve kendi koşulları içerisinde standardizasyonu sorgulamaları gerekmektedir^{2,4,7,8}. Fermenter olmayan bakteriler son yıllarda yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere hastanelerde sıklığı artan patojenler arasında görülmektedirler. Bu mikroorganizmalar, yapıları ve mutasyona meyilleri, yol açtıkları fatal enfeksiyonlar ve antibiyotiklere direnç durumları nedeniyle özel olarak ele alınmalıdır⁹⁻¹¹. Rutin laboratuvarlarda DD sonuçlarını etkileyebilecek faktörler çok çeşitli ve değişkendir ve sorun çıktığı her zaman kesin tespiti mümkün olmayabilir. Çalışmamızda saptanan oranı çok yüksek olmamakla birlikte, E-test ile orta derecede dirençli olarak görünen *Pseudomonas* suşlarının DD ile duyarlı sonuç vermesi, in vitro koşullarda majör hata olarak değerlendirilebilir. Özellikle ciddi enfeksiyonlarda mortaliteyi direk olarak etkileyen sonuçlara yol açabilir.

Her iki yöntem arasında ortaya çıkan farklılığın MİK ile orta dirençli olarak değerlendirilen suşların, DD ile duyarlı görünürken zon çaplarının sınıra çok yakın olması, hatanın tekrarlanabilirliğinin düşük olduğunu düşündürmektedir. Hatanın tekrarlanabilirliğinin araştırılması amacıyla, lot numaraları farklı diskler kullanılabilir ve diğer değişkenler gözden geçirilebilir. Çalışmamızda bu durum araştırılmamıştır, zira çalışmamızın amacı uygun testin aranması değil, rutin laboratuvar uygulamaları sırasında kalite kontrol normları içerisinde kabul edilen bir uygulamanın yol açabileceği sakıncalı durumlara dikkati çekmektir.

Karbapenem direncini tespitte DD testinin özellikle meropenem için yalancı dirençli sonuçlara yol açtığı dikkat çekmiştir. Bu konu yöntemin yanı sıra etken madde stabilitesi sorgulanmasını ya da meropenem disklerinin günlük kalite kontrolünün yapılması konusunu gündeme getirebilir. Önlem alınmadığı takdirde bu sorun tedavi açısından zaten kısıtlı olan antibiyotik seçeneklerini azaltacak, ayrıca ülkemiz adına epidemiyolojik verilerde yanlış değerlendirmelere neden olabilecektir. Çalışmamızda E-test yerine altın standart olarak sıvı dilüsyon testi daha güvenilir bir karşılaştırma sağlayabilir diye düşünülürse de, uygulama kolaylığı ile birlikte E-testin bu bakteri grubu için güvenilir olduğu saptanmıştır¹².

Karbapenem grubu antibiyotikler, dirençli Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında oldukça etkin kullanım alanı bulmuştur^{13,14}. Kullanım sıklığının yüksek olması nedeniyle fermenter olmayan Gram negatif bakterilerde artmakta olan direnç, son yıllarda enterik Gram negatif bakterilerde de görülmeye başlanmış potansiyel bir tehlike olarak karşımıza çıkmaktadır¹⁵⁻¹⁸.

Bu çalışma direnç oranı tespit etmek amacıyla yapılmamıştır. İş yoğunluğu fazla olan ve DD testi kalite kontrolünü CLSI'de önerilen şekilde yapan bir laboratuvarın, rutin testlerinin sorgulanması sırasında dikkati çeken bir durumun

bildirilmesi ve bunun rutin uygulamalara yansiyacak sonuçlarına dikkat çekilmesi amaçlanmıştır. Rutin laboratuvar pratiğinde DD ile tespit edilmiş meropenem direncinin hastalara iletilmeden önce farklı bir yöntem ile doğrulanması uygun olacaktır. Bu konu epidemiyolojik verilerin toplanması sırasında da göz önünde bulundurulmalıdır. Bu çalışmada gözlenen durumun bizim kullandığımız uluslar arası geçerliliği onaylanmış disk markası dışındaki değişik markalar için de söz konusu olup olmadığının belirlenmesi de uygun olacaktır. Ayrıca laboratuvar disk kalite kontrolleri ile ilgili verilerin, marka ve lot numarası belirtilerek kayıt altında tutulması, retrospektif sorgulamalar sırasında laboratuvarlar arası kıyaslamaların yapılmasına olanak verecektir.

KAYNAKLAR

1. Members of SFM Antibiogram Committee: Comite de L'Antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie: Report 2003. Int J Antimicrob Agents 2003, 21: 364-391.
2. Potz NA, Mushtaq S, Johnson AP, et al: Reliability of routine disc susceptibility testing by the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) method. J Antimicrob Chemother 2004, 53: 729-738.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)/NCCLS: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved Standard M100 S15, 2005. CLSI/NCCLS Pennsylvania.
4. Ferraro MJ: Should we re-evaluate antibiotic breakpoints? Clin Infect Dis 2001, 33: 227- 229.
5. Stevenson KB, Samore M, Barbera J, et al: Detection of antimicrobial resistance by small rural hospital microbiology laboratories: comparison of survey responses with current NCCLS laboratory standards. Diagn Microbiol Infect Dis 2003, 47: 303-311.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Approved Standard M100 S13, 2003. NCCLS Pennsylvania.
7. Jorgensen JH: Laboratory issues in detection and reporting of antibacterial resistance. Infect Dis Clin North Am 1997, 11: 785-802.
8. Livermore DM, Chen HY: Quality of antimicrobial susceptibility testing in the UK: a *Pseudomonas aeruginosa* survey revisited. J Antimicrob Chemother 1999, 43: 517-522.
9. Oliver A: Hypermutation in natural bacterial populations: consequences for medical microbiology. Rev Med Microbiol 2005, 16: 25-32.
10. Gales AC, Jones RN, Forward KL, et al: Emerging importance of multidrug resistant *Acinetobacter* spp and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features and trends in the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-1999). Clin Infect Dis 2001, 32: 104-113.
11. Livermore DM: Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? Clin Infect Dis 2002, 34: 634-640.
12. Joyce LF, Downes J, Stockman K, Andrew JH: Comparison of five methods including the PDM Epsilometer test (E Test), or antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 1992, 30: 2709-2713.
13. Colardyn F, Edwards JR: Carbapenems in difficult to treat infections in the ICU. Clin Intensive Care 1996, 7: 19-24.
14. Bradley JS, Garau J, Lode H, et al: Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. Int J Antimicrob Agents 1999, 11: 93-100.
15. Livermore DM, Woodford N: Carbapenemases: a problem waiting? Curr Opin Microbiol 2000, 3: 489-495.

16. Auburn C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P: Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S rivers. *Emerg Infect Dis* 2005, 11: 260-264.
17. Poirel L, Heritier C, Spicq C, Nordmann P: In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2004, 42: 3831-3833.
18. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P: Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48: 15-22.