

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEEN SUŞLARIN TANISINDA İKİ FARKLI KROMOJENİK AGARIN PERFORMANSI

THE PERFORMANCE OF TWO DIFFERENT CHROMOGENIC MEDIA FOR THE DIAGNOSIS OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE PRODUCING STRAINS

Fulya BAYINDIR BİLMAN¹, Füsün CAN¹, Şule ÇOLAKOĞLU², Iştar DOLAPÇI³, Müge DEMİRBİLEK¹, Melek KAYA¹, Hande ARSLAN⁴

¹ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (filyabilman@mynet.com)

² Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Adana.

³ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

⁴ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Bu çalışmada, Eylül-Kasım 2007 tarihleri arasında Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesine başvuran hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığının tespitinde 2 farklı kromojenik agarın performansının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, GSBL varlığı çift disk sinerji (ÇDS) testi ile belirlenen 255 *E.coli* ve 110 *Klebsiella* spp. olmak üzere toplam 365 (251 pozitif, 114 negatif) suş alınmış, tüm suşlar Drigalski agar (Stürenburg ve arkadaşlarının tanımladığı formüle göre hazırlandı) ve chromID ESB (bioMérieux, Fransa) agara ekilerek, GSBL varlığı Drigalski agarda 4. ve 24. saatlerde, chromID agarda ise 24. saatte değerlendirilmiştir. ÇDS yöntemi ile kromojenik besiyerlerinde elde edilen sonuçlar arasında uyumsuzluk gözlenen suşlarda *TEM*, *SHV*, *CTX-M* genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Çalışmamızda, GSBL pozitifliği Drigalski agarda 4. ve 24. saatte sırasıyla; 238 ve 235, chromID ESB agarda ise 24. saatte 259 izolatta tespit edilmiştir. ÇDS ile GSBL pozitif bulunan 159 *E.coli* suşunun tümü (%100) chromID ESB agarda; 150 (%94.3)'si ise Drigalski agarda pozitif sonuç vermiştir. Bu oranlar *Klebsiella* spp. suşları için sırasıyla; %100 (92/92) ve %92.3 (85/92) olarak belirlenmiştir. ÇDS ile negatif bulunup, chromID ESB agarda üreme gösteren 8 (2 *E.coli*, 6 *Klebsiella* spp.) suşa uygulanan PCR sonucuna göre 1'inde *SHV*, 6'sında *CTX-M*, 1'inde ise *TEM* ve *CTX-M* birlikteliği gözlenmiştir. Drigalski agarda 4. saatte elde edilen sonuçların 24. saat bulguları ile uyumlu olması, bu besiyerinin hızlı tanıda kullanılabileceği yönünde olumlu bir sonuç olarak yorumlanmıştır. Bulgularımız, kromojenik besiyerlerinin rutin laboratuvarlarda GSBL üreten bakterilerin hızlı tanısı için kullanılabileceğini düşündürmekle birlikte, bu besiyerlerinin tanısal duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi için standart referans yöntemlerle yapılacak olan karşılaştırmalı çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: GSBL, çift disk sinerji testi, Drigalski agar, chromID ESB agar.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the performances of 2 different chromogenic media for the detection of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolated from different clinical samples of patients who were admitted to Baskent University Faculty of Medicine, Adana Application and Research Hospital between September to November 2007. A total of 365 strains [251 were ESBL positive and 114 were negative by double disk synergy (DDS) test] of which 255 were *E.coli* and 110 were *Klebsiella* spp. were included to the study. All the isolates have been inoculated onto Drigalski agar (prepared following the formula described by Stürenburg et al.) and chromID ESBL agar (bioMérieux, France) and the production of ESBL were evaluated at 4th and 24th hours for Drigalski agar, and at 24th hours for chromID ESBL agar. The strains which yielded contradictory results by DDS test and chromogenic media, were tested for the presence of *TEM*, *SHV* and *CTX-M* genes by polymerase chain reaction (PCR). The number of ESBL positive strains on Drigalski agar at 4th and 24th hours were 238 and 235, respectively, while chromID ESBL agar detected 259 ESBL positive strains at 24th hours. All (100%) of the 159 ESBL positive *E.coli* strains by DDS test were also found positive on chromID ESBL agar, and 150 (94.3%) were found positive on Drigalski agar. These rates were detected as 100% (92/92) and 92.3% (85/92) for *Klebsiella* spp. isolates. Eight of the strains (2 *E.coli*, 6 *Klebsiella* spp.) which yielded negative results by DDS test but positive on chromID ESBL agar, harboured *SHV* (n=1), *CTX-M* (n=6) and *TEM* + *CTX-M* (n=1) genes detected by PCR. As a result, the consistency of the results obtained by Drigalski agar at 4th and 24th hours has indicated that this medium may provide advantages in rapid diagnosis of ESBL producing bacteria in routine laboratories. The data obtained for chromogenic media seemed to be favourable for the rapid diagnosis of ESBL production, however comparative studies with the use of standard reference methods are needed in order to determine diagnostic sensitivity and specificity of these media.

Key words: ESBL, double disk synergy, Drigalski agar, chromID ESBL agar.

GİRİŞ

Gram-negatif basillerde plazmid aracılığı ile aktarılan geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere direnç, ciddi hastane enfeksiyonlarında tedavi zorluklarına neden olan dünya çapında önemli bir sorundur¹. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) en sık *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli*'de görülmesine karşın *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyelerinde ve *Pseudomonas aeruginosa*'da da saptanmıştır². GSBL üreten bakterilerin tanımlanmasında, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" tarafından önerilen disk difüzyon testinde karşılaşılan en önemli sorun, ekspresyonun azlığına ya da inokulumun etkisine bağlı olarak zon çaplarının değişmesi ve izolatların yanlış duyarlı olarak saptanmasıdır. Rutin laboratuvarlarda elde edilen bu sonuçlar klinikte tedavi başarısızlıklarına yol açmaktadır. Bu nedenle GSBL üreten klinik izolatların laboratuvarında doğru ve hızlı bir şekilde tespit edilebilmesi için standart yöntemlere ihtiyaç vardır³.

GSBL tespitinde kullanılan çift disk sinerji (ÇDS) testi, üç boyutlu test, dilüsyon yöntemleri, otomatize sistemler (Vitek) ve E-test gibi yöntemlere alternatif olarak, son yıllarda maliyetlerinin düşük ve güvenilir olmaları nedeniyle kromojenik besiyerlerinin rutin laboratuvarlarda kullanılabilirliği yönünde çok sayıda araştırma yapılmaktadır⁴⁻⁶. Örneğin; sefotaksim içeren bir kromojenik besiyeri olan Drigalski aganın GSBL üreten suşların hızlı tanısında kullanılabileceği önerilmektedir⁴. ChromID ESBL agar (bioMérieux) ise sefopodoksime içermekte ve kromojenik substratları ile bakterileri hem tür düzeyinde ayırt et-

mekte hem de GSBL üretimini gösterebilmektedir⁷. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *E.coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında GSBL varlığının saptanmasında, ÇDS yöntemi ile 2 farklı kromojenik agar (Drigalski ve chromID ESB) ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesine Eylül 2007-Kasım 2007 tarihleri arasında başvuran hastaların kan, idrar, pü ve diğer vücut sıvılarından izole edilen ve GSBL varlığı ÇDS testi ile belirlenen 255 *E.coli* ve 110 *Klebsiella* spp. olmak üzere toplam 365 suş alındı.

GSBL taramasında kullanılan ÇDS testinde, 0.5 McFarland standardına eş değer hazırlanan bakteri süspansiyonları Mueller-Hinton agara ekildi. Aztreonam, seftriakson, seftazidim ve sefepim diskleri, merkezden 25 mm uzaklığa yerleştirilip, merkeze amoksisilin-klavulanik asit diski konuldu. İnkübasyondan sonra, amoksisilin-klavulanik asit diski ile diğer diskler arası sinerji saptanması GSBL yönünden pozitif olarak kabul edildi⁸.

Drigalski agar, GSBL tarama agarı olarak Stürenburg ve arkadaşlarının⁴ tanımladığı formülasyona göre 7.4 g/l pepton (Becton Dickinson, ABD), 8.5 g/l laktoz (Merck, Almanya), 0.025 g/l bromkresol moru (Merck, Almanya), 12 g/l bakteriyolojik agar no.1 (Merck, Almanya) ve 1.5 mg/l sefotaksim içerecek şekilde hazırlandı. Besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra 37°C'de inkübe edildi. Drigalski agarda 4. saatten itibaren üremelerin ortaya çıkması nedeniyle sonuçlar hem 4. saat hem de 24. saatte değerlendirildi. Besiyerinde hiç üreme olmaması GSBL negatifliği, sarı renkte oluşan koloniler ise GSBL pozitifliği olarak kabul edildi^{4,9}. Suşlar arasından mor renkte hafif üreme gösterenler, GSBL yönünden yorumlama kriterlerine uymadığından şüpheli olarak değerlendirildi⁷.

ChromID ESB Agar (bioMérieux, Fransa) üretici firmadan hazır olarak sağlandı. Suşlar plaklara ekildikten sonra yine 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. GSBL pozitif olan *E.coli* suşları pembe-vişne çürüğü renginde, *Klebsiella* spp. suşları ise yeşil renkte koloniler oluşturarak üredi. Hiç üreme olmaması GSBL negatifliği olarak değerlendirildi^{6,7}.

ÇDS yöntemi ile kromojenik besiyerlerinde elde edilen sonuçlar arasında uyumsuzluk gözlenen suşlarda *TEM*, *SHV*, *CTX-M* genleri özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırıldı¹⁰⁻¹². DNA ekstraksiyonu ticari bir kit ile (Nucleospin Tissue/Macherey-Nagel, Almanya) üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. *TEM* için 1074 baz çifti (bç), *SHV* için 1016 bç ve *CTX-M* için 550 bç'lik PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 100 V elektrik akımında elektroforez ile yürütüldü ve ultraviyole transillüminatör (TFX 20M, Vilber Lourmat, Fransa) ile görüntüldü.

BULGULAR

Çalışmaya alınan *E.coli* suşlarının %62.3 (159/255)'ü ve *Klebsiella* spp. suşlarının %83.6 (92/110)'sı olmak üzere suşların toplam %68.7 (251/365)'inde ÇDS testi ile GSBL pozitifliği saptanmıştır. ÇDS ile GSBL pozitif bulunan 159 *E.coli* suşunun tümü chromID ESB agarda pozitif bulunurken, 150 (%94.3)'sü Drigalski agarda pozitif sonuç

vermiştir. ÇDS ile pozitif bulunan 92 *Klebsiella* spp. suşunun ise 85 (%92.3)'ünde Drigalski agarda, tümünde ise chromID ESBL agarda pozitiflik tespit edilmiştir. *E.coli* suşlarının 87'si Drigalski agarda da negatif görülürken 10'u mor renkte hafif üreme gösterdiğinden şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Aynı şekilde *Klebsiella* spp. izolatlarından 20'si Drigalski agarda negatif bulunurken, 5'i şüpheli olarak yorumlanmıştır. *E.coli* suşlarının 94'ü chromID ESBL agarda negatif olarak değerlendirilirken ÇDS ile negatif bulunan 2 suş pembe renkli koloniler yapmıştır. *Klebsiella* spp. suşlarının 12'si chromID ESBL agarda negatif olarak tespit edilirken ÇDS ile negatif bulunan 6'sı yeşil renkte koloniler meydana getirerek üremiştir. ÇDS ile negatif bulunup, chromID ESBL agarda üreme gösteren 2 *E.coli* ve 6 *Klebsiella* spp. suşuna yapılan PCR sonucuna göre 1'inde *SHV*, 6'sında *CTX-M*, 1'inde ise *TEM* ve *CTX-M* birlikteliği gözlenmiştir.

E.coli suşlarından 151'i Drigalski agarda 4. saatte sarı renkli koloniler oluşturarak ürerken; 24. saatte 150 suş bu özellikte üreme göstermiştir. Bir suş 4. saatte plağın ilk alanında sarı renk değişikliğine neden olduğu için başlangıçta pozitif olarak yorumlanmış, ancak 24. saatte ekim alanlarında koloni oluşumu gözlenmediği için negatif kabul edilmiştir. Yine aynı sebeple, *Klebsiella* spp. suşlarından 2'si, 4. saatte ilk alanda sarı renk değişimini başlattığı için pozitif olarak yorumlandığı halde, 24. saatte negatif olarak değerlendirilmiştir. Bundan dolayı *Klebsiella* spp. suşlarının 87'si 4. saatte, 85'i ise 24. saatte pozitif kabul edilmiştir.

TARTIŞMA

Son yıllarda tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin etken olduğu enfeksiyonlar artış göstermektedir. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda, *E.coli* izolatlarında %7.2-32, *Klebsiella* spp. izolatlarında ise %42-56.5 arasında değişen oranlarda GSBL pozitifliği tespit edilmiştir¹³⁻¹⁷.

Yapılan klinik çalışmalarda, GSBL pozitif izolatların erken tanısının, hastanede kalış süresini kısalttığı ve hasta başına maliyeti azalttığı bildirilmektedir¹⁸. CLSI, GSBL tanısında disk difüzyon yöntemini önermektedir⁸, ancak bu yöntem düşük duyarlılığa sahiptir. Tarama amaçlı kullanılan ÇDS yöntemi ise zaman alıcıdır ve güvenilirliği düşüktür. Bu nedenle GSBL üreten izolatların tanısı için rutin kullanımda duyarlılığı yüksek, güvenilir, hızlı ve maliyeti düşük testlere ihtiyaç vardır.

GSBL direncinin hızlı ve doğru olarak saptanması için yeni besiyerleri üzerinde birçok çalışma mevcuttur^{4-6,19,20}. Kromojenik besiyerleri ile GSBL üretiminin hızlı tanısının yapılabilmesinin yanı sıra bazılarında farklı enzimlerin kullanılması ile hem bakterinin tiplen-dirilmesi hem de GSBL üretiminin aynı anda gösterilebilmesi mümkün olmaktadır. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında direkt örneklerde, erken tanıda bu özellik önemli bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 50 GSBL pozitif, 50 GSBL negatif izolat ile yapılan bir çalışmada, Quicolor ES agar ile MHA karşılaştırılmış ve QC agarın tüm GSBL pozitif izolatları doğru tespit ettiği gösterilmiştir²⁰. Glupczynski ve arkadaşlarının ESBL-Bx (bioMérieux, Fransa) kullanarak 644 klinik izolatla yaptıkları çalışmada, kromojenik agarın duyarlılığı %97.7 bulunmuştur^{5,6}.

Stürenburg ve arkadaşları⁴, Drigalski agarın duyarlılığını %88 olarak bildirmiş; Ünalı ve arkadaşları⁹ ise Drigalski agar ile ÇDS yöntemi arasında %98.8 uyum olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da, Drigalski agar ile elde edilen sonuçların ÇDS yöntemi ile elde edilen sonuçlarla uyumu yüksek bulunmuş ve verilerimiz, diğer çalışmaların bulguları ile paralellik göstermiştir. Ayrıca, Drigalski agarda 4. saatte elde ettiğimiz sonuçların 24. saat bulguları ile uyumlu olması, erken tanıda kullanılabileceği yönünde olumlu bir sonuç olarak yorumlanmıştır.

GSBL tespitinde diğer bir kromojenik besiyeri olan chromID ESBL agarın performansının araştırıldığı ve 765 örneği içeren bir çalışmada, 24. saatte duyarlılık %88 olarak bulunmuş ve 48. saatte bu oran %94'e ulaşmıştır⁷. Montgomery ve arkadaşları²¹ da chromID ESBL agarın duyarlılığını %95 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, ÇDS yöntemi ile GSBL pozitif bulunan tüm suşlar chromID ESBL agar ile de 24. saatin sonunda pozitif bulunmuş; ayrıca, ÇDS ile GSBL negatif olarak tespit edilen 8 izolatın *TEM*, *SHV*, *CTX-M* genlerine sahip olduğu PCR ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar chromID ESBL agarın GSBL tanısında duyarlılığının yüksek olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca, chromID ESBL agar, kromojenik substratları içermesi nedeniyle, tüm *E.coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarının, sırasıyla pembe ve yeşil koloniler oluşturarak üremesine ve tiplendirmenin doğru olarak yapılmasına olanak sağlamıştır. Sonuç olarak, çalışmamızın bulguları kromojenik besiyerlerinin rutin laboratuvarlarda GSBL üreten bakterilerin hızlı tanısı için kullanılabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Al-Jasser Asma M. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem. *Kuwait Med J* 2006; 38: 171-85.
2. Kaçmaz B, Çakır FÖ, Aksoy A. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* türlerinde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz saptanması. *ANKEM* 2005; 19: 125-9.
3. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-51.
4. Stürenburg E, Sobottka I, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new screen agar plate for detection and presumptive identification of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51: 51-5.
5. Glupczynski Y, Berhin C, Bauraing C, Bogaerts P. Evaluation of a new selective chromogenic medium for detection of extended-spectrum beta-lactamases producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 501-5.
6. Glupczynski Y, Berhin C, Bauraing C, Bogaerts P. Novel chromogenic medium from bioMérieux for detection of ESBL-producing *Enterobacteriaceae*. *ICAAC*, 2006, San Francisco. Poster no: D-0457.
7. Réglier-Poupet H, Naas T, Carrer A, et al. Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Med Microbiol* 2008; 57: 310-5.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th Informational Supplement. Document M100-S18. 2008, CLSI, Wayne, PA.
9. Ünalı Ö, Engin D, Yalınay Çırak M. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin saptanmasında agar tarama plakları ve çift disk sinerji yönteminin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41: 369-76.
10. Taşlı H, Bahar İH. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58: 162-7.

11. Mohamed H, Mohamed S, Irith W. First description of CTX-M β -lactamase-producing clinical *Escherichia coli* isolates from Egypt. Int J Antimicrob Agent 2006; 27: 545-8.
12. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, et al. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 29-35.
13. Işık F, Arslan U, Tuncer İ. Klinik örneklerden soyutlanan *Klebsiella* türlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığı ve antibiyotik duyarlılığı. Enfeksiyon Dergisi 2007; 21: 33-8.
14. Gülay Z. Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye Haritası. ANKEM 2005; 19: 66-77.
15. Geyik MF, Kökoğlu ÖF, Uçmak H ve ark. Hastane kaynaklı gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Enfeksiyon Dergisi 2002; 16: 175-8.
16. Akçam FZ, Gönen I, Kaya O ve ark. Hastane enfeksiyonu etkeni enterobakterilerde beta-laktam antibiyotiklere duyarlılık ve ESBL sıklığının araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2004; 11: 6-9.
17. Gür D, Gülay Z, Akan Arıkan Ö ve ark. Türkiye’de hastane izolatu gram-negatif bakterilerde yeni beta-laktam antibiyotiklere direnç ve GSBL tipleri: çok merkezli HITİT surveyansının sonuçları. Mikrobiyol Bul 2008; 42: 537-44.
18. Barenfanger F, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol 1999; 37: 1415-8.
19. Cagatay AA, Kocagöz T, Eraksoy H. Dio Sensimedia: a novel culture medium for rapid detection of extended spectrum beta-lactamases. BMC Infect Dis 2003; 3: 22.
20. Ercis S, Sancak B, Kocagöz T, et al. Rapid 4 to 6 hour detection of extended-spectrum beta-lactamases in a routine laboratory. Scand J Infect Dis 2007; 39: 781-5.
21. Montgomery J, Wang J, Nakos J, et al. ChromID ESBL agar for the detection of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008, Barcelona, Spain.