

# Basitrasine Duyarlılık Deneyinin A Grubu Streptokokları Tanımlamada Değeri

Aynur TOPKAYA(\*), Esra SALAM(\*\*), Pınar ÇIRAGİL(\*\*\*), Candan JOHANSSON(\*)

(\*) Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

(\*\*) Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

(\*\*\*) Kahraman Maraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kahraman Maraş

## ÖZET

Basitrasinin inhibisyon testinin, 75 adet A grubu, 46 adet A grubu dışı , toplam 121 beta hemolitik streptokok kökenini tanımlamadaki güvenilirliği araştırılmıştır. Duyarlılık testi 0.04 İÜ/ml. basitrasinin içeren ticari disk ile CO<sub>2</sub>'li ve CO<sub>2</sub>'siz ortamda yapılmıştır. Ölçülen zon çapları sırasıyla 'cut off' noktası kabul edilerek , o zon çapının A grubu streptokoku tanımlama duyarlılığı, seçiciliği, pozitif ve negatif öngörü değerleri hesaplanmıştır. En yüksek değerlerin elde edildiği zon çapı 15 mm. olmuştur. Bu zon çapı 'cut-off' olarak kabul edildiğinde duyarlılık % 97.77, seçicilik % 98.68, pozitif öngörü değeri % 97.72 negatif öngörü değeri % 98.68 olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler : Basitrasinin, inhibisyon, A grubu streptokoklar.

## SUMMARY

The Value of Bacitracin Susceptibility Testing in the Identification of Group A Streptococci

The reliability of the bacitracin inhibition test to differentiate between 75 group A and 46 non- group A beta-hemolytic streptococci was studied. The test was performed by commercially available discs containing 0.04 IU/ml. bacitracin under atmospheric conditions with and without CO<sub>2</sub>. Each of the zone sizes were used as cut off points to obtain the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values. The most reliable, highest values were obtained with a zone size of 15mm. diameter. The use of a 15mm. zone as a cut off point, 97.77 %, 98.68 %, 97.72 % and 98.68 % were calculated for sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value respectively.

Key Words : Bacitracin, inhibition, group A streptococci.

## GİRİŞ

Streptococcus pyogenes ( A grubu beta hemolitik streptokok ) oluşturduğu infeksiyonlar, süpüratif ve süpüratif olmayan sekelleri ile tüm dünyada yaygın önemli bir insan patojenidir.

A grubu beta hemolitik streptokok (AGS) infeksiyonları üst solunum yolu infeksiyonları arasında en sık saptanan bakteriyel infeksiyonlardır(1). Streptokok farenjitlerini , diğer farenjitlerden ayırmak için yalnızca klinik belirtiler yeterli olmamakta, kesin tanı ve uygun tedavi için güvenilir bakteriyolojik yöntemler gerekmektedir. Bakterilerin doğru tanımlanması, romatizmal ateş, romatizmal kalp hastalıkları, akut post streptokoksik glomerulonefrit gibi süpüratif olmayan sekeller ve invaziv AGS infeksiyonları-

nın da kontrol edilebilmesini sağlar(2). AGS' ları diğer beta-hemolitik streptokoklardan ayırmak için, basitrasinin duyarlılığı, PYR testi, Ouchterlony çift difüzyon testi ve latex aglutinasyon testi gibi testler kullanılabilir(3). AGS' ların basitrasine göstermiş oldukları yüksek oranlarda duyarlılık ve bu testin uygulama kolaylığı basitrasinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan test olmasına neden olmuştur. Testin AGS' ları tanımlamadaki güvenilirliğini optimize etmeye yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır.1953' de Maxted (4) 0,5 İÜ basitrasinin emdirilmiş diskleri kullanarak yaptığı çalışmada kökenlerinin % 99,9 oranında doğru tanımlandığını bildirmiştir Levinson ve Frank (5) 1955' de farklı besiyerleri ve farklı çapta diskler (4-6 mm) kullanarak yaptıkları çalışmada 0.02 İÜ/ ml basitras-

sin içeren disklerle optimum performans sağlandığını belirtmişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalarda bazı araştırmacılar 0.1 İÜ/ml. basitrasın içeren disklerle AGS' ları daha doğru tanımladıklarını bildirmişlerdir. Ancak yüksek basitrasın konsantrasyonlarının A grubu dışındaki streptokokların da üremesini inhibe ettiği görülmüştür (6). Bugün mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan yöntem, 0.04 İÜ/ml. basitrasın içeren disklerin kullanıldığı yöntemdir. Bu konsantrasyondaki basitrasının pratikte tüm A gruplarında az veya çok inhibisyon zonu oluşturduğu kabul edilmektedir. Ancak bu durumda testin sonucu A grubu için spesifik olmayıp C,G ve hatta B grubu streptokokları da tanımlayabilmektedir.

Basitrasın diski ticari olarak sağlanabileceği gibi rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında da hazırlanabilmektedir. Testin sonucu, diğer duyarlılık testlerinde de olduğu gibi, kullanılan besiyeri, bakteri yoğunluğu, inkübasyon koşulları gibi faktörlerden etkilenmektedir.

Basitrasın duyarlılık testinin standardizasyonu ile ilgili çalışmalarda, daha çok basitrasın konsantrasyonunun testin duyarlılığına etkisi tartışılmış, ölçülen inhibisyon zonunun testin sonucuna etkileri ile de değişik savlar ortaya atılmıştır.

Bu çalışmada ticari disk ile uygulanan duyarlılık testinde, ölçülen farklı zon çaplarının ve CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyonun testin duyarlılık ve seçiciliğine etkisi araştırılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Bakteriler:** Çeşitli muayene maddelerinden izole edilen toplam 121 beta-hemolitik streptokok kökeni çalışmaya alınmıştır. Kökenler koyun kanlı Todd-Hewitt buyyonunda -20 °C'de saklanmıştır.

**Besiyerleri:** Duyarlılık testleri için %5 koyun kanlı Mueller-Hinton agar, kökenlerin -20 °C'de muhafazası için %5 koyun kanlı Todd-Hewitt buyyonu kullanılmıştır. Duyarlılık testlerinde kullanılacak bakteri kültürleri Todd-Hewitt buyyonunda hazırlanmıştır.

**Serogruplama:** Kökenler serolojik olarak streptokok gruplama kiti (OXOID, Hampshire, UK) kullanılarak serogruplara ayrılmıştır.

**Basitrasın duyarlılık testi:** 0.04 İÜ/ml. basitrasın içeren disklerle yapılmıştır. Kanlı agardaki streptokok kolonilerinden tek koloni alınarak 2 ml Todd-

Hewitt buyyonuna ekilmiş ve 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda süspansiyonun bulanıklığı Mac Farland No: 0,5 tüpünün bulanıklığına eşdeğer olmuştur(7). Bu süspansiyon da 1/10 kez sulandırıldıktan sonra bundan 10 ml alınarak %5 koyun kanlı Mueller-Hinton agara homojen olarak yayılmış ve yüzeyi kuruduktan sonra üzerine antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Her bir streptokok kökeni için iki besiyeri kullanılmış, bunlardan biri CO<sub>2</sub>'li diğeri CO<sub>2</sub>'siz ortamda , 18-20 saat, 35 °C'de inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda oluşan zon çapları kompas ile okunarak kaydedilmiştir.

**İstatistiksel analiz:** Sonuçlar SPSS 10.0 paket programında elektronik ortama geçirilerek analiz edilmiştir. Antibiyotik diskleri için 6 mm' den başlayarak 18 mm 'ye kadar okunan tüm değerler sırasıyla 'cut-off' noktası olarak alınmış ve her birinin altın standart (serogrup) ile uyumu araştırılmıştır. Zon çaplarının herbiri için duyarlılık, seçicilik, pozitif öngörü değeri ve negatif öngörü değeri hesaplanmıştır. Seçicilik ve duyarlılık açısından en üst nokta en ideal nokta olarak alınmıştır. Ayrıca çalışmada yapılan tüm ölçümler açısından değişkenlerin herbirinin birbirleri ile korelasyonu Pearson' un korelasyon testi ile analiz edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan 121 beta hemolitik streptokok kökeni serogrup olarak ayrıldığında 75' inin grup A, 46' sının A grubu dışındaki serogruplara (B, C, D,G) ait olduğu belirlenmiştir. Bu serogrupların elde edildiği muayene maddelerine göre dağılımları Tablo 1'de görülmektedir.

Oluşan zon çaplarının analizinde, A grubu ve A grubu dışı beta hemolitik streptokokların ortalama zon değerleri ve standart sapmaları göz önüne alınarak , okunan tüm değerler sırasıyla 'cut-off' olarak alındığında, hesaplanan duyarlılık, seçicilik, pozitif öngörü ve negatif öngörü değerleri CO<sub>2</sub>'li ve CO<sub>2</sub>'siz inkübasyon koşulları için ayrı ayrı Tablo 2 ve Tablo 3 'de görülmektedir.

CO<sub>2</sub> li ortamda inkübasyon, testin duyarlılığını ve değişkenlerin birbirleriyle korelasyonunu arttırmaktadır (p< 0.05). Bu inkübasyon koşullarında testin yorumu, herhangi bir zon oluşumuna göre (6 mm) yapıldığında % 24 oranda A grubunun tanımla-

**Tablo 1. Beta-hemolitik streptokokların çeşitli muayene maddelerine göre dağılımı**

Serogruplar	Muayene Maddeleri				
	Boğaz sürüntüsü	Vagen sürüntüsü	Yara sürüntüsü	İdrar	Toplam
A	68	-	7	-	75
B	2	37	-	3	42
C	3	-	-	-	3
D	-	1	-	-	1
Toplam	73	38	7	3	121

**Tablo 2. 121beta-hemolitik streptokok kökeninin CO<sub>2</sub> 'li ortamda basitrasine karşı verdiği inhibisyon zonlarına göre hesaplanan duyarlılık (D), seçicilik(S), pozitif öngörü (PÖD) ve negatif öngörü (NÖD) değerleri**

Zon Çapı (mm)	D (%)	S(%)	PÖD(%)	NÖD(%)
6	75.55	100.00	100.00	87.35
10	93.33	100.00	100.00	96.20
12	95.55	100.00	100.00	97.43
14	95.55	98.68	97.72	97.40
15	97.77	98.68	97.77	98.68
16	97.77	97.16	95.65	98.66
17	97.77	92.10	88.00	98.59
18	100.00	76.31	71.42	100.00

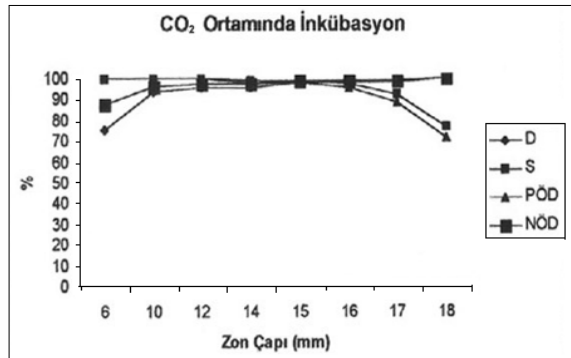
**Tablo 3. 121 beta- hemolitik streptokok kökeninin CO<sub>2</sub> 'siz ortamda basitrasine karşı verdiği inhibisyon zonlarına göre hesaplanan duyarlılık (D), seçicilik (S), pozitif öngörü (PÖD) ve negatif öngörü (NÖD) değerleri**

Zon Çapı (mm)	D (%)	S(%)	PÖD(%)	NÖD(%)
6	48.88	97.36	91.66	76.28
10	75.55	96.05	91.89	86.90
12	86.66	94.73	90.69	92.30
14	91.11	93.42	89.13	94.66
15	91.11	92.10	87.23	94.59
16	91.11	90.78	85.41	94.52
17	91.11	85.52	78.84	94.20
18	93.33	77.53	71.18	95.16

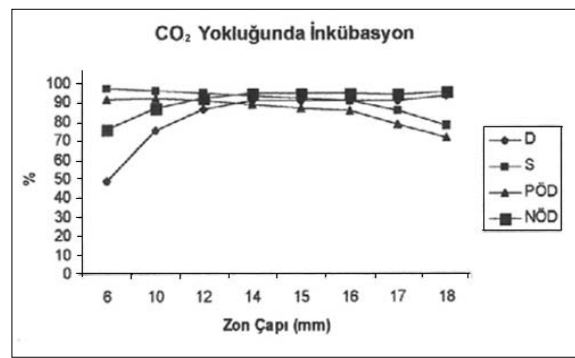
namadığı,buna karşılık seçiciliğin % 100'e ulaştığı görülmektedir.' Cut-off 'olarak 18mm alındığında test A grubunun tümünü doğru tanımlamakta , ancak bu kez A grubu dışı streptokoklar da % 24 oranında yanlış olarak grup A olarak tanımlanmaktadır. CO<sub>2</sub> 'li inkübasyon koşulları için hesaplanan tüm değerler açısından ideal 'cut-off' noktası 15mm. olarak sap-

tanmıştır (Tablo. 2, Şekil 1).CO<sub>2</sub> 'siz ortamdaki inkübasyon koşullarında cut-off değeri olarak 6mm alındığında duyarlılık % 50'nin altına düşmektedir. Bu değerler 18mm için sırasıyla; duyarlılık % 93.33, seçicilik % 77.63, PÖD % 71.18 ve NÖD %95.16 olarak hesaplanmıştır. Bu koşullarda ideal değerleri sağlayan 'cut-off' noktası 14 mm. olmuştur .(Tablo. 3,

**Şekil 1. 121 beta-hemolitik streptokok kökeninin 0.04 İÜ/ml. 'lik basitrasine karşı CO<sub>2</sub>'li ortamda verdiği farklı inhibisyon zonları ile elde edilen D,S, PÖD yüzdeleri.**



**Şekil 2. 121 beta-hemolitik streptokok kökeninin 0.04 İÜ/ml. 'lik basitrasine karşı CO<sub>2</sub>'siz ortamda verdiği farklı inhibisyon zonları ile elde edilen D,S, PÖD yüzdeleri.**



Şekil 2).

Zon çaplarına göre hesaplanan duyarlılık, seçicilik, PÖD ve NÖD 'nin CO<sub>2</sub> 'li ve CO<sub>2</sub> 'siz inkübasyon koşullarında birbirleriyle ilişkisi Şekil 1 ve Şekil 2'de görülmektedir.

## TARTIŞMA

Beta hemolitik streptokokların presipitasyon yöntemiyle serogruplanması oldukça zor, vakit alıcı ve deneyim gerektiren işlemlerdir. Ticari olarak bulunan aglütinasyon kitleri de pahalılığı ve çapraz reaksiyonlar verebilmesi nedeniyle birçok rutin laboratuvar için uygun değildir.

A grubu dışındaki streptokokların da giderek artan oranlarda patojen olarak tanımlanması bu serogrupların tanımlanmasında da duyarlı yöntemlerin kullanılmasını gerekli kılmaktadır.

Beta hemolitik streptokokların tanımlanmasında uygulama kolaylığı ve ucuzluğu nedeniyle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tercih edilen basitrasın duyarlılık testinin güvenilirliğini optimize etmeye yönelik yorumlama kriterlerinin oluş-turulması gerekmektedir. Basitrasın inhibisyon testlerinin sonuçlarını yorumlamak için ya inhibisyon zonunun oluşup oluşmaması, yada belli bir zon çapının 'cut off' noktası olarak seçilmesi gerekmektedir. Çeşitli çalışmalarla bu iki yöntem karşılaştırılmıştır. Coleman ve ark. (8) zon oluşup oluşmaması ölçütünü esas aldıklarında bu yöntemde, 0.04 ünitelik basitrasın diski kullanmanın NCCLS veya ACP (Association of Clinical Pathologists) koşullarında 0.1 ve 0.02 ünitelik disklerle üstünlük gösterdiğini, ancak ACP yöntemi ile 125 grup A kökeninden 3'ünün tanımlanamadığını saptamışlardır. 0.1 ünitelik disk kullanıldığında NCCLS yöntemi ile grup A dışı 122 kökenden 24'ünün, ACP yöntemi ile de 37'sinin yanlış tanımlandığını bildirmişlerdir. 0.02 ünitelik disk kullanıldığında 125 grup A kökeninden 18'inin ve 27'sinin sıra ile NCCLS ve ACP yöntemleri ile tanımlanamadığını gözlemlemişlerdir. 0.1 ünite disk için 12 mm'lik zon çapı 'cut off' noktası seçildiğinde her iki yöntemle de grup A kökenlerinin güvenilir bir şekilde tanımlandığını, ancak 15 mm'lik zon çapı esas alındığında sonuçların tatminkar olmadığını bildirmişlerdir. Washington ve ark. (9) 0.02 ve 0.04 ünitelik basitrasın diskleri kullanarak 11 mm'lik zon çapını 'cut

off' noktası olarak aldıklarında A grubu streptokokların güvenilir bir şekilde ayırıldığını bildirmişlerdir. Leshner ve ark. (6) 200 beta hemolitik streptokok kökeni ile yaptıkları çalışmalarda herhangi bir zon oluşmasını grup A için tanımlayıcı kriter olarak aldıklarında %96 oranda doğru olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, en güvenilir sonuçlar 0.04 ünitelik disklerle 15 mm'lik zon çapı 'cut off' noktası olarak seçildiğinde, CO<sub>2</sub>'li inkübasyon koşullarında elde edilmiştir. 12 mm'lik zon çapı ile 121 beta hemolitik streptokok kökeninin %7'si yanlış olarak tanımlanmış; 15 mm'nin üstündeki zon çaplarında testin A grubu dışı beta hemolitikleri tanımlama başarısının azaldığı görülmüştür.

Sonuç olarak, ticari basitrasın diski etrafında zon oluşup oluşmamasını ölçüt alan kalitatif değerlendirmeler yanında, 14'mm'nin altındaki inhibisyon zonunun ölçüldüğü kantitatif değerlendirmeler ile de beta hemolitik streptokok ayırımının sağlıklı yapılamayacağı görülmüştür (Tablo 2 ve 3). İstatistiksel verilerle de desteklenen bulgularımızdan basitrasın inhibisyon testinden güvenilir sonuçlar alabilmek için inhibisyon zon çapı ölçümünün önemli olduğu ortaya çıkmıştır. A grubu beta hemolitik streptokokların güvenilir bir şekilde tanımlanması için 15 mm'lik inhibisyon zonunun 'cut off' noktası olarak alınmasını öneriyoruz. Diğer serogrupların tanımlanması için de benzer şekilde yorumlama ölçütleri oluşturulmalıdır.

## KAYNAKLAR:

- 1. Bisno AL, Van De Rijn I:** Classification of Streptococci. "G L Mandell, J E Bennett, R Dolin (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases", p.1784 Churchill Livingstone, New York (2000).
- 2. Kaplan EL:** Global assesment of rheumatic fever and rheumatic heart disease at the close of the century. The influences and the dynamics of population and pathogens: a failure to realize prevention? Circulation 88:1964 (1993).
- 3. Kaplan EL, Johnson DR, Sramek J, Bicova R, Havlicek J, Havlickova H, Motlova J, Kriz P:** Laboratory Diagnosis of Group A Streptococcal Infections, p.23-32 WHO Geneva (1996).
- 4. Maxted WR:** The use of bacitracin for identifying group A haemolytic streptococci. J Clin Pathol 6:224(1953).
- 5. Levinson, M. L. and Frank, P. F:** Differentiation of group A from other beta hemolytic streptococci with bacitracin, J Bact 69:284(1995).

**6. Leshner R.J, Castino Colon E.A:** Comparasion of fluorescent antibody, Bacitracin susceptibility, lateks agglutination, coagglutination, and API 20s for identifying group A streptococci. Canadian J Microbiol 31:335(1985).

**7. Van Asselt GJ, Mouton RP:** Detection of penicillin tolerance in Streptococcus pyogenes. J Med Microbiol 38:1971 (1993).

**8. Coleman DJ, Mcghe D, Tedbutt G. M:**Further studies on the reliability of the bacitracin inhibition test for the presumptive identification of Lancefield group A streptococci. J Clin Path 30: 421 (1977).

**9. Washington JA, Martin WJ and Karlson. :** Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. J.A.Washington (Ed)II.Little Br Boston(1974).

## **BURS DUYURUSU**

FEMS (Federation of European Microbiological Societies) tarafından, Cemiyetimizce seçilecek bir üyeye, 2003 yılında yararlanmak üzere kısa süreli yurtdışı araştırma bursu verilecektir.

Yaş sınırı 35 tir. Adayların, gideceği ülkedeki çalışmaları izleyecek, araştırmaları yürütecek kadar yabancı dil bilgisi sahibi olmaları gerekmektedir. Yönetim kurulu, adayın yabancı dil bilgisini kanıtlamasını isteyebilir. İlgilenen üyelerimizin yaşam hikayesi, yayın listesi, bir referans mektubu, çalışma programı ve süresi, tahmini giderler ve yurtdışında çalışmayı düşündükleri laboratuvarın kabul yazısı ile 25 Mayıs 2003 tarihine kadar Cemiyetimiz Yönetim Kurulu'na başvurmaları rica olunur.