

Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Tanımlanmasında ChromID ESBL Agar Besiyerinin Değerlendirilmesi †

Duygu DAĞLAR *, Zübeyde ERES SARITAŞ **, Betil ÖZHAK BAYSAN **, Gözde ÖNGÜT **, Dilara ÖGÜNÇ **, Dilek ÇOLAK **

Serik Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı *, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı **

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının tanımlanmasında ChromID ESBL agar (bioMérieux, France) besiyerinin performansını değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: GSBL üretimi doğrulanmış 90'ı *E. coli* ve 25'i *K. pneumoniae* olmak üzere toplam 115 izolat, ChromID ESBL agar seçiciliğinin ve kromojenik özelliklerinin değerlendirilmesi için ekilmiştir.

Bulgular: Doksan *E. coli* izolatının 83'ü (%92.2) ChromID ESBL agarda beklenildiği gibi pembe-bordo renkli koloni oluşturmuş, beşi (%5.6) açık kahverengi koloni oluşturarak üretici firma tarafından tanımlanan kromojenik özelliklere göre PMP (*Proteus* / *Morganella* / *Providencia*) grubunda yer alan tür olarak değerlendirilmiştir. İki *E. coli* suşu besiyerinde ürememiştir. Yirmi beş *K. pneumoniae* izolatının 24'ü (%96) beklenildiği gibi yeşil renkli koloni oluşturmuş, bir izolat besiyerinde ürememiştir. *E. coli* izolatlarında GSBL üretiminin saptanmasında ChromID ESBL agarın duyarlılığı %97.8, doğru tür tanımı ile birlikte GSBL üretiminin saptanmasında duyarlılık ise %92.2 olarak bulunmuştur. *K. pneumoniae* izolatlarında doğru tür tanımı ile birlikte GSBL üretiminin saptanmasında ChromID ESBL agarın duyarlılığı %96 olarak bulunmuştur.

Sonuç: ChromID ESBL agar, GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının hızlı tanımlanmasında duyarlılığı yüksek yararlı bir besiyeridir.

Anahtar kelimeler: ChromID ESBL agar, *E. coli*, *K. pneumoniae*

SUMMARY

Evaluation of ChromID ESBL Agar Medium for the Identification of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates

Objective: The aim of this study was to evaluate the performance of the ChromID ESBL agar (bioMérieux, France) for the presumptive identification of extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates.

Materials and Methods: A total of 115 isolates (90 *E. coli* and 25 *K. pneumoniae*) with confirmed ESBL production were inoculated onto ChromID ESBL agar to evaluate the growth selectivity and chromogenic features of the medium.

Results: Of the 90 *E. coli* isolates, 83 (92.2%) produced the expected red-burgundy colony color on ChromID ESBL agar, five (5.6%) displayed light brown colonies which were regarded as the species of the PMP (*Proteus*/*Morganella*/*Providencia*) group according to the expected chromogenic features provided in the manufacturers' specifications. Two *E. coli* strains did not grow on ChromID ESBL agar. Of the 25 *K. pneumoniae* isolates, 24 (96%) produced the expected green colony color on ChromID ESBL agar whereas one isolate did not grow on the medium. For *E. coli* isolates the sensitivity of ChromID ESBL agar for ESBL detection was 97.8% and for ESBL detection together with correct species identification was 92.2%. For *K. pneumoniae* isolates the sensitivity of ChromID ESBL agar for ESBL detection with correct species identification was 96%.

Conclusion: ChromID ESBL agar is a useful and sensitive medium for rapid presumptive identification of ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates.

Key words: ChromID ESBL agar, *E. coli*, *K. pneumoniae*

Alındığı tarih: 04.07.2011

Kabul tarihi: 28.11.2011

Yazışma adresi: Dilara Ögünç, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dumlupınar Bulvarı 07070 Antalya

e-posta: dogunc@akdeniz.edu.tr

†Bu çalışma "XXXIV.Türk Mikrobiyoloji" Kongresi'nde bildiri olarak sunulmuştur. (7-11 Kasım 2010, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti)

GİRİŞ

Beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta-laktamaz enzim üretimi, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL), sıklıkla *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* türleri tarafından salgılanan, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonamı hidrolize eden ve plazmid aracılığıyla aktarılan enzimlerdir ^(1,2). GSBL üreten mikroorganizmalarla gelişen hastane enfeksiyonlarının görülme sıklığı giderek artmakta, bu mikroorganizmaların çoklu ilaç direncine de sahip olmaları enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir ⁽³⁾. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 2010 yılında *Enterobacteriaceae* ailesi için sefalosporinlerden sefazolin, sefotaksim, seftazidim, seftizoksim ve seftriakson ile aztreonam duyarlılık sınır değerlerinde (breakpoint) değişiklik yapmış, yeni duyarlılık sınır değerlerinin kullanılması durumunda GSBL testinin yapılmasının gerekli olduğunu, testin epidemiyolojik ve enfeksiyon kontrolü açısından yararlı olduğunu bildirmiştir ⁽⁴⁾. GSBL üretiminin saptanmasında fenotipik yöntemler ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Genotipik yöntemler sıklıkla referans laboratuvarlarda veya araştırmalarda kullanılırken klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında GSBL üreten suşların saptanmasında genellikle fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. CLSI'nin önerisine göre fenotipik yöntem iki aşamalı olup, önce tarama testi ardından doğrulama testi uygulanmaktadır. Tarama testinde, test edilen bakterinin GSBL indikatörü antimikrobiyal ajanlar olan sefpodoksime, seftazidim, aztreonam, sefotaksim ve seftriaksona direnci araştırılır. GSBL varlığının doğrulanmasında ise indikatör sefalosporinlerden sefotaksim ve seftazidim ile klavulanik asit arasındaki sinerjinin gösterilmesi esastır ⁽³⁻⁷⁾. Fenotipik yöntemler arasında çift disk sinerji, Etest, otomatize sistemlerin yanı sıra çeşitli kromojenik agarlar da kullanılmaktadır. ChromID ESBL agar, sefpodoksimin de içinde bulunduğu antibiyotik karışımı ve iki kromojenik substrat içeren ve GSBL varlığının saptanmasında kullanılan bir besiyeridir.

Çalışmamızda GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının tanımlanmasında ChromID ESBL agar (bioMérieux, Fransa) kromojenik besiyerinin perfor-

mansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen GSBL üreten 90'ı *E. coli* ve 25'i *K. pneumoniae* olmak üzere toplam 115 izolat çalışmaya alınmıştır. İzolatlar konvansiyonel yöntemler ve otomatize sistem (Phoenix, Becton Dickinson, ABD) ile tanımlanmış, GSBL üretimleri Etest (bioMérieux, Fransa) yöntemi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılarak belirlenmiştir. İzolatlardan 0.5 McFarland bula- nıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlanmış, bu süspansiyonlardan 10µl alınarak ChromID ESBL agara ekilmiştir. İzolatların, üretici firmanın önerisi doğrultusunda 18-24 saat inkübe edilen besiyerlerinde oluşturdukları koloni renkleri incelenmiştir. Standart inkübasyon süresi sonunda üreme saptanmayan suşlar için ileri inkübasyon yapılmamıştır. Üretici firmanın önerisine göre; *E. coli* suşlarının pembe-bordo, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* suşlarının mavi/yeşil/kahve-yeşil, *Protea* kabilesinin (*Proteus*, *Morganella*, *Providencia*) açık-koyu kahverengi koloni oluşturması GSBL üretimi olarak kabul edilmiştir.

Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 suşları kullanılmıştır.

BULGULAR

ChromID ESBL agara ekilen, GSBL ürettiği bilinen 90 *E. coli* suşunun 83'ü (%92.2) beklenildiği gibi pembe-bordo renkli koloni oluşturarak GSBL üreten *E. coli*, beşi (%5.6) açık kahverengi koloni oluşturarak GSBL üreten *Proteus/Morganella/Providencia* olarak yorumlanmıştır. *E. coli* suşlarının ikisi (%2.2) ChromID ESBL agarda ürememiştir. Yirmi beş *K. pneumoniae* suşunun 24'ü (%96) yeşil renkli koloni oluşturmuş ve GSBL pozitif olarak tanımlanmış, bir suş (%4) besiyerinde ürememiştir.

Çalışmamızda 90 *E. coli* suşunda GSBL üretiminin saptanmasında ChromID ESBL agarın duyarlılığı %97.8, doğru tür tanımı ile birlikte GSBL üretiminin saptanmasında duyarlılık ise %92.2 olarak bulunmuştur. Yirmi beş *K. pneumoniae* suşunda doğru tür tanımı ile birlikte GSBL üretiminin saptanmasında

duyarlılık %96 olarak saptanmıştır.

TARTIŞMA

Hastane enfeksiyonu etkenleri içinde önemli yeri olan gram negatif bakterilerde GSBL üretimine bağlı direnç giderek yaygınlaşmaktadır. Bu direnç, yüksek ve çoklu antibiyotik direnci özelliğinde olduğundan tedavi seçimi ve etkinliğinde sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle GSBL'nin en kısa sürede ve doğru olarak saptanması, erken dönemde enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasını ve hastaların uygun şekilde tedavi edilmesini sağlar.

Sefpodoksim içerdiği için GSBL üreten bakterileri seçmenin yanı sıra *E. coli*, *Klebsiella/Enterobacter/Serratia/Citrobacter* ve *Proteae* grubu bakterilerin ayırımını yapabilen ChromID ESBL agar hızlı tanı sağlayan ticari kromojenik bir besiyeridir.

GSBL tespitinde chromID ESBL agarın performansının araştırıldığı ve 765 klinik örneği içeren bir çalışmada, 24. saatte duyarlılık %88 olarak bulunmuş ve 48. saatte bu oran %94'e ulaşmıştır⁽⁸⁾. Overdevest ve ark.⁽⁹⁾ GSBL üretiminin saptanmasında iki ticari agar plağı ve iki doğrulama tekniğinin performansını değerlendirmiştir. Bu çalışmaya karbapenem direnci ve/veya GSBL üreten ya da kinolon, aminoglikozid, kotrimaksazol grubu antibiyotiklerden en az ikisine dirençli olan toplam 642 izolat dahil edilmiştir. Araştırmacılar izolatları Grup 1: *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Salmonella* spp ve *Shigella* spp ve Grup 2: *Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp, *Morganella morganii*, *Serratia* spp ve *Providencia* spp olarak iki gruba ayırmışlardır. Grup 1'de 291 GSBL üreten 214 GSBL üretimi olmayan, Grup 2'de ise 65 GSBL üreten ve 70 GSBL üretimi olmayan suş yer almıştır. Araştırmacılar ChromID agar'ın duyarlılığını Grup 1 ve Grup 2'de yer alan mikroorganizmalarda sırasıyla %97.3 ve %98.5 olarak saptamıştır. Montgomery ve ark.⁽¹⁰⁾ da ChromID ESBL agarın duyarlılığını %95 olarak bildirmiştir. Huang ve ark.⁽¹¹⁾ çalışmalarında, GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyesi suşlarda ChromID ESBL agar ve Brilliance ESBL agarın etkinliğini test etmiştir. duyarlılıklarını %94.9 özgüllüklerini ise sırasıyla %95.5 ve %95.7 olarak saptamıştır. Bilman ve ark.⁽¹²⁾ yaptığı bir çalışmada, GSBL pozitif bulunan tüm suşların ChromID ESBL agar ile 24. saatin sonunda pozitif olduğu sap-

tanmıştır.

Çalışmamızda 90 *E. coli* suşunda GSBL üretiminin saptanmasında ChromID agarın duyarlılığı %97.8, doğru tür tanımı ile birlikte GSBL üretiminin saptanmasında duyarlılık ise %92.2 olarak bulunmuştur. Beş *E. coli* suşunda GSBL üretimi saptanırken doğru tür tanımı yapılamamıştır. Yirmi beş *K. pneumoniae* suşunda doğru tür tanımı ile birlikte GSBL üretiminin saptanmasında duyarlılık %96 olarak saptanmıştır. Kromojenik besiyerlerinde kromojenik substrat ile saptanması istenen bakterilerin izolasyon ve/veya tanımlanması ve üremesi istenmeyen organizmaların inhibisyonu için gerekli antimikrobik ajanlar bulunmaktadır. Bu besiyerlerinde bulunan antimikrobik karışımlarının konsantrasyonları, besiyerinin duyarlılık ve özgüllüğünü etkileyebilmektedir. Çalışmamızda ChromID ESBL agarda bazı suşların ürememesi buna bağlı olabilir.

Bu çalışmanın sonuçları diğer araştırmacıların sonuçları ile benzerdir. Çalışmamızın başlıca kısıtlılıkları, GSBL üretimi olmayan suşların çalışmaya dâhil olmaması, yalnızca *E. coli* ve *Klebsiella* suşlarının test edilmiş olmasıdır. Ayrıca besiyerinin performansının yalnız GSBL ürettiği bilinen klinik izolatlarla değerlendirilmiş olması, klinik örneklerin değerlendirilmede yer almaması da çalışmamızın bir diğer kısıtlılığı olarak sayılabilir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre ChromID ESBL agar *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında GSBL üretiminin araştırılmasında yüksek duyarlılığa sahip olması ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle önerilebilecek bir besiyeridir.

KAYNAKLAR

1. **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. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001> PMID:11585791 PMCID:89009
2. **Bush K.** New beta-lactamases in gram negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1085-9. <http://dx.doi.org/10.1086/319610> PMID:11264037
3. **Procop GW, Tuohy MJ, Wilson DA, Williams D, Hadziyannis E, Hall GS.** Cross-class resistance to on beta-lactam antimicrobials in extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Am J Clin Pathol* 2003; 120:265-7. <http://dx.doi.org/10.1309/BWQKWB2WN6W5X1CC> PMID:12931557

4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement, M100-S20. Wayne PA: CLSI, 2010.
5. **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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.08.009> PMID:15629229
6. **Falagas ME, Karageorgopoulos DE.** Extended spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect* 2009; 73: 345-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2009.02.021> PMID:19596491
7. **Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K.** Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean J Lab Med* 2008; 28:401-12. <http://dx.doi.org/10.3343/kjlm.2008.28.6.401> PMID:19127103
8. **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. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47625-0> PMID:18287293
9. **Overdeest IT, Willemsen I, Elberts S, Verhulst C, Kluysmans JA.** Laboratory detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: evaluation of two screening agar plates and two confirmation techniques. *J Clin Microbiol* 2011; 49:519-22. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01953-10> PMID:21123527 PMCid:3043506
10. **Montgomery J, Wang J, Nakos J, Gurtler V.** ChromID ESBL agar for the detection of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(Suppl 7):S233.
11. **Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Guisset A, Glupczynski Y.** Evaluation of brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2010; 48:2091-6. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02342-09> PMID:20410342 PMCid:2884496
12. **Bayındır Bilman F Can F, Çolakoğlu Ş ve ark.** Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten suşların tanısında iki farklı kromojenik agarın performansı. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44:105-10. PMID:20455405