Comparison of Disk Diffusion and E-Test Methods for Doripenem Susceptibility of Nosocomial Acinetobacter Baumannii Strains

Nozokomiyal Acinetobacter Baumannii Suşlarında Doripenem Duyarlılığının Saptanmasında Disk Diffüzyon ve E-Test Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Acinetobacter Baumannii Suşlarının Doripenem Duyarlılığı / Doripenem Susceptibility of Acinetobacter Baumannii Isolates

Yeşim Çekin[1], Hülya İren Güvenç[2], Betil Özhak Baysan[2], Duygu Dağlar[1], Özge Turhan[3], Gözde Öngüt[2], Dilara Öğünç[2], Dilek Çolak[2], Ata Nevzat Yalçın[3]
[1]Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, [2]Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
[3]Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

Özet

Amaç: Acinetobacter türleri son yıllarda hastanemiz yoğun bakım hastalarında en sık rastlanan ilk iki etken arasında yer almaktadır. Ülkemizde kullanıma yeni sunulan doripenem, bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek etkinlik gösteren, karbapenem grubu geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Çalışmalarda özellikle ventilatör ilişkili pnömoni etkeni olarak izole edilen Acinetobacter baumannii suşlarında doripenemin duyarlılıkları araştırılmıştır. Çalışmamızda nozokomiyal infeksiyonlarda etken olarak izole edilen Acinetobacter baumannii suşlarının doripenem duyarlılıklarının saptanmasında disk diffüzyon ve E-test yöntemlerinin karşılaştırmayı amaçladık. Gereç ve Yöntem: Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'na 1 Ocak-31 Aralık 2009 tarihleri arasında yoğun bakımlardan gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 94 Acinetobacter baumannii suşunun disk diffüzyon ve Etest yöntemleri ile doripenem duyarlılıkları belirlenmiştir. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından belirlenen minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK); duyarlı ≤1 µg/ml, orta duyarlı 2-4 µg/ml ve dirençli >4 µg/ml olarak ve 10 µg'lık disklerle inhibisyon zonu çapları, duyarlı <15mm, dirençli ≥21mm olarak kullanılmıştır. Bulgular: Disk diffüzyon yöntemiyle; 10 izolat duyarlı, 17 izolat orta duyarlı, 67 izolat ise dirençli saptanırken, E-test yöntemiyle; 12 izolat duyarlı, 12 izolat orta duyarlı, 70 izolat ise dirençli saptanmıştır. E-test yöntemi ile disk diffüzyon yöntemi arasındaki kategorik uyum (orta duyarlı izolatlar dirençli kabul edilerek), %88.3 (83/94) olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda büyük hata, ve küçük hata oranları sırasıyla %1.2 (1/82) ve %18.1 (17/94) olarak saptanmış, çok büyük hata saptanmamıştır. Tartışma: Sonuç olarak rutin laboratuvar pratiğinde Acinetobacter türlerine karşı doripenem duyarlılıkları saptanırken disk diffüzyon ile E-test yöntemlerinin yüksek düzeyde uyum gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler

Acinetobacter Baumannii; E-Test; Disk Diffüzyon; Doripenem

Abstract

Aim: Acinetobacter species are amoung the most common two cause of infections isolated from patients of intensive care unit in our hospital. Doripenem which acts by inhibiting cell wall synthesis is resently introduced for use in our country is broad spectrum antibiotic belonging to carbapenems. There are many studies investigating the susceptibility of doripenem of Acinetobacter baumannii which is isolated as a cause of ventilatory associated pneumonia in the literature. We aimed to compare e-test and disc diffusion methods for doripenem susceptibility of acinetobacter baumannii strains as nosocomial infections Acinetobacter baumanni isolates detected as nosocomial infection. Material and Method:. Between January to December, 2009 a total of 94 Acinetobacter baumanni strains isolated from different clinical specimens from intensive care units have been studied for doripenem susceptibility by disc diffusion and E-test methods. Minimal inhibitory consantrations (MIC) were accepted as; sensitive ≤1 µg/ml, intermadiate 2-4 µg/ml, resistant >4 µg/ml and diameters of inhibition zone with 10 µg disc; sensitive <15mm, resistant ≥21mm according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Results: In our study, 10 isolates were sensitive, 17 isolates were intermediate, 67 isolates were resistant by disc diffision method whereas 12 isolates were sensitive, 12 isolates were intermediate and 70 isolates were resistant by E-test method. The categorical aggreement between disc diffusion and E-test methods (intermedite isolates were considered as resistant) were found as 88.3% (83/94). In our study majör disrepancy and minör discrepancy rates were 1.2% (1/2) and 18.1% (17/94) respectively. There was no very majör discrepancy. Discussion: As a result in routine laboratory practice there is a high level of aggreement of determining doripenem susceptibility of Acinetobacter spp by disc diffusion and E-test mehods.

Keywords

Acinetobacter Baumannii; E-Test; Disk Diffusion; Doripenem

DOI: 10.4328/JCAM.2029 Received: 21.08.2013 Accepted: 11.09.2013 Printed: 01.05.2015 J Clin Anal Med 2015;6(3): 332-334
Corresponding Author: Dilara Öğünç, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji, Antalya, Türkiye.
T.: +905353509783 E-Mail: dogunc@akdeniz.edu.tr

Giriş

Acinetobacter türleri özellikle yoğun bakım ünitelerinde ve konak savunması bozulmuş hastalarda ventilatörle ilişkili pnömoni, üriner sistem enfeksiyonu, endokardit, sepsis ve menenjit gibi ciddi nozokomiyal enfeksiyonlar oluşturan bakterilerdir [1-3]. Acinetobacter türlerinin hastane ortamında özellikle nemli yüzeylerde uzun süre canlı kalabilmesi dirençli suşların kolaylıkla yayılmasına sebep olmaktadır [4-6]. Aminoglikozidler, kinolonlar ve karbapenemleri de içeren pek çok antibiyotiğe karşı son yıllarda saptanan yüksek direnç oranları, bu bakterilere bağlı enfeksiyonlarda ciddi tedavi sorunları yaratmakta, olası Acinetobacter enfeksiyonu tanısı ile izlenen hastalarda, ampirik tedavi seçeneklerini önemli ölçüde kısıtlamaktadır [7]. Acinetobacter türlerinin neden olduğu enfeksiyonların kısıtlı tedavi seçenekleri arasında karbapenemler ön sırada yer almaktadır. Doripenem, karbapenem grubunun yeni bir üyesi olup Gram negatif, Gram pozitif ve anaerop mikroorganizmalara etkili bir antibiyotiktir [8]. Çalışmamızda hastane enfeksiyon etkeni Acinetobacter baumannii izolatlarında doripenem duyarlılığının saptanmasında disk diffüzyon (DD) ve E-test yöntemleri arasındaki uyumun araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

01 Ocak-31 Aralık 2009 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yoğun bakımlardan gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve hastane enfeksiyon etkeni olduğu belirlenen 94 A. baumannii izolatı çalışmaya alınmıştır. Çalışmamız örnekleri retrospektif olarak hastane veri tabanı taranarak seçilmiş ve mikrobiyoloji stok suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enfeksiyon dışında bir nedenle hastaneye başvuran ve yattığı tarihte inkübasyon döneminde olmayan, enfeksiyonun belirti ve bulguları saptanmayan hastaların, yatıştan en az 48 saat sonrasında ortaya çıkan enfeksiyonlar hastane enfeksiyonu olarak kabul edilmiştir. Izolatların 44'ü trakeal aspirat, iki'si balgam, altı'sı idrar, 37'si kan ve beş'i kateter örneklerinden oluşmaktadır. Her hastadan sadece bir izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Örnekler, %5 kanlı agar, çukulata agar ve EMB agara ekilerek 37°C'de inkübasyona bırakılmış, 24 saat sonunda üremeler değerlendirilmiştir. Acinetobacter morfolojisindeki koloniler, Gram boyama, oksidaz ve katalaz aktivitesi, koloni morfolojileri açısından değerlendirilmiş, tür tayinleri ve antibiyotik duyarlılıkları Phoenix otomatize sistemi (BD Diagnostics, Sparcs, MD) ile gerçekleştirilmiştir. Doripenem duyarlılıkları E-test (AB Biodisk, İsveç) ve 10 µg'lık disk diffüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu işlemler için 18 saatlik kültürlerden her bir izolat için, 0.5 McFarland ayarında (108CFU/ml) bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra 15cm'lik petri kutularında 4mm kalınlığında iki adet Mueller Hinton agara eküvyonla yüzey ekimi yapılmış, E-test stripleri ve 10 µg'lık doripenem diskleri besiyerlerinin yüzeyine yerleştirilmiştir. 35°C'de 18-24 saatlik inkübasyondan sonra sonuçlar okunmuştur.

Çalışmamızda, Acinetobacter baumannii için European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından belirlenen minimal inhibitör konsantrasyonları (MIC); duyarlı ≤1 µg/ml, orta duyarlı 2-4 µg/ml ve dirençli >4 µg/ml olarak ve 10 µg'lık disklerle inhibisyon zonu çapları, duyarlı <15mm, dirençli ≥21 olarak kullanılmıştır (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Document issued on: 02. 11, 2013). Kalite kontrol suşu olarak Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 kullanılmıştır. Çalışmamızda, direnç oranları hesaplanırken, orta derecede duyarlı olan suşlar dirençli kategorisine alınarak kategori uyumu (category aggreement), çok büyük hata (very major discrepancy), büyük hata (major discrepancy) ve küçük hata (minor discrepancy) oranları hesaplanmıştır

Bulgular

Disk diffüzyon yöntemiyle; 10 izolat duyarlı, 17 izolat orta duyarlı, 67 izolat ise dirençli saptanırken, E-test yöntemiyle; 12 izolat duyarlı, 12 izolat orta duyarlı, 70 izolat ise dirençli saptanmıştır. A. baumanni izolatları için doripenem E-test ve DD testlerinin çapraz direnç durumları Tablo 1'de sunulmaktadır. İki yöntem arasındaki farkın değerlendirilebilmesi amacıyla E-test yöntemi ile DD yöntemi arasındaki kategorik uyum, orta duyarlı izolatlar dirençli kabul edilerek, %88.3 (83/94) olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda büyük hata, ve küçük hata oranları sırasıyla %1.2 (1/82) ve %18.1 (17/94) olarak saptanmış, çok büyük hata saptanmamıştır.

Tablo1. A. baumanni izolatları için doripenem E–test ve Disk diffüzyon testlerinin çapraz direnç durumları

	Disk Diffüzyon			Toplam
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli	
E-test				
Duyarlı	8	4	-	12
Orta duyarlı	1	6	5	12
Dirençli	1	7	62	70
Toplam	10	17	67	94

Tartışma

Karbapenemler, geniş spektrumlu aktiviteye sahip beta-laktam antibiyotiklerdir [9-11]. Son yıllarda farklı antimikrobiyal aktiviteye sahip çok sayıda karbapenem geliştirilmiştir [9,10]. Yeni bir karbapenem olan doripenem, komplike intraabdominal ve idrar yolu enfeksiyonları ile nozokomiyal pnömoni ve ventilatörle ilişkili pnömoni tedavisinde etkili bir ajandır [12-15]. Ayrıca, imipeneme göre santral sinir sistemi yan etkilerinin daha düşük olması ve uzun süreli infüzyon ile yüksek serum konsantrasyonlarına ulaşabilmesi nedeniyle hastane kaynaklı komplike bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ümit veren bir antibiyotiktir [15]. Tedavi seçenekleri zaten kısıtlı olan A. baumanni izolatlarında, doripenem duyarlılığının diğer karbapenemlere ek olarak test edilmesi klinik laboratuvarların rutin çalışmalarında önem taşımaktadır. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), doripenem için duyarlılık sınır değerlerini henüz belirlememiştir [16]. Ayrıca otomatize sistemlerin duyarlılık panellerinde de doripenem tanımlanmamıştır. Bu nedenle laboratuvarlar, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından belirlenen minimal inhibitör konsantrasyonları (MIC); ve 10 µg'lık disklerle inhibisyon zonu çaplarını referans alarak çalışmaktadırlar.

Antibiyotiklere duyarlılığının saptanmasında referans yöntem olarak kullanılan agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri kantitatif değerler verirken, rutin kullanımda uygulaması zor ve zaman alıcı yöntemlerdir. En yaygın olarak kullanılan DD yönte-

minde ise, duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olmak üzere kantitatif olmayan sonuçlar verilmektedir. DD yöntemindekine benzer zaman ve emek harcanarak yapılan diğer bir yöntem olan E-test ise bir strip üzerinde giderek artan antibiyotik konsantrasyonu içeren ve kantitatif sonuçlar elde edilebilen bir testtir [17,18]. Çalışmamızda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan duyarlılık test sonuçları ile %96 uyum gösterdiği bildirilen E-test metodu kullanılmış ve DD metodu ile karşılaştırılmıştır [19].

Çalışmamızda 17 izolatta küçük hata, bir hastada da büyük hata saptanırken çok büyük hata saptanmamıştır. Disk diffüzyon yöntemiyle beşi dirençli ve biri duyarlı altı izolat, E-test yöntemiyle orta duyarlı saptanmış; DD yöntemiyle orta duyarlı saptanan 11 izolatın ise, E-test yöntemiye yedisi dirençli, dördü duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Sadece bir izolatta büyük hata saptanmıştır. DD yöntemi ile duyarlı (22mm) saptanan bir izolat E-test yöntemi ile dirençli (MİK=32mg/L) değerlendirilmiştir. Çalışmamızda hatanın tekrarlanabilirliği araştırılmamıştır, zira çalışmamızın amacı uygun testin aranması değil, rutin laboratuvar uygulamaları sırasında bu iki test arasındaki uyumun araştırılmasıdır. Bu nedenle çalışmamız uluslar arası geçerliliği onaylanmış disk ve E-test markaları ile ve aynı lot numaraları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak rutin uygulamalarda bu gibi durumlarda lot numaraları farklı diskler kullanılabilir ve diğer değişkenler (Mc Farland ayarları, besi yeri kalınlığı, inkübasyon süresi) gözden geçirilebilir. İki yöntem arasında saptanan hata oranı (%5.7), yöntemin yanı sıra doripenem disklerinin ve E-test striplerinin etken madde stabilitesin sorgulanmasını da gündeme getirebilir. Bu çalışmada gözlenen durumun değişik markalar için de söz konusu olup olmadığının belirlenmesi de uygun olacaktır. Şimdiye kadar E-test yöntemiyle Acinetobacter türlerinin farklı hasta gruplarında doripenem duyarlılıkları bildirilmiştir [20, 21]. Ancak rutin laboratuvarlarda ucuz olması ve kullanım kolaylığı açısından DD yöntemi tercih edililebilmektedir. Bu çalışma direnç oranı tespit etmek amacıyla yapılmamıştır. Acinetobacter türlerinde doripenem duyarlılığının DD veya E-test yöntemleriyle çalışılmasının rutin uygulamalara yansıyacak sonuçlarına dikkat çekilmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak rutin laboratuvar pratiğinde Acinetobacter türlerine karşı doripenem duyarlılıkları saptanırken DD ile E-test yöntemlerinin yüksek düzeyde uyum gösterdiği tespit edilmiştir. DD yöntemiyle duyarlılıklar bildirilmeden önce özellikle zon çapları sınıra yakın olan izolatların E-test yöntemiyle doğrulanması uygun olacaktır.

Çıkar Çakışması ve Finansman Beyanı

Bu çalışmada çıkar çakışması ve finansman destek alındığı beyan edilmemiştir.

Kaynaklar

1. İnci A, Güven D, Atasoy R. Microorganisms Isolated from Various Clinical Samples of Intensive Care Unit Patients and their Antibiotic Susceptibilities. J Clin Anal Med 2014;5(6):466-8.
2. Eser ÖK, Ergin A, Hasçelik G. Erişkin hastalardan izole edilen Acinetobacter türlerinde antimikrobiyal direnç ve metallobeta-laktamaz varlığı. Mikrobiyol Bul 2009;43(3):383-90.
3. Çetin ES, Kaya S, Pakbaş İ, Demirci M. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. İnönü Üni Tıp Fak Derg 2007;14(2):69-73.
4. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro Surveill 2008;13(47):19045.
5. Arman D. Yoğun bakımda gram negatif bakteri sorunu, ANKEM Derg 2009;23(Ek-2):148-56.
6. Başustaoğlu A, Özyurt M. Nozokomiyal patojen olarak Acinetobacter'lerin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri, Hastane İnfeksiyon Derg 1998;2(2):88-93.
7. Eser ÖK, Kocagöz S, Ergin A, Altun B, Hasçelik G. Yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyon etkeni olan gram- negatif basillerin değerlendirilmesi. İnfeksiyon Dergisi 2005;19(1):75-80.
8. Fujimura T, Anan N, Sugimori G,Watanabe T, Jinushi Y, Yoshida I et al. Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in Japan to doripenem and other antipseudomonal agents. Int J Antimicrob Agents 2009;34(6):523-8.
9. Nicolau DP. Carbapenems: a potent class of antibiotics. Expert Opin Pharmacother 2008;9(1):23-37.
10. Shah PM. Parenteral carbapenems. Clin Microbiol Infect 2008;14:175-80.
11. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ et al. Comparative review of the carbapenems. Drugs 2007;67(7):1027-52.
12. Keam SJ. Doripenem: a review of its use in the treatment of bacterial infections. Drugs 2008;68(14):2021-57.
13. Matthews SJ, Lancaster JW. Doripenem monohydrate, a broad-spectrum carbapenem antibiotic. Clin Ther 2009;31(1):42-63.
14. Lucasti C, Jasovich A, Umeh O, Jiang J, Kaniga K, Friedland I. Efficacy and tolerability of IV doripenem versus meropenem in adults with complicated intra-abdominal infection: a phase III, prospective, multicenter, randomized, double-blind, noninferiority study. Clin Ther 2008;30(5):868-83.
15. Dedhia HV, McKnight R. Doripenem: position in clinical practice. Expert Rev Anti Infect Ther 2009;7(5):507-14.
16. Paterson DL, Depestel DD. Doripenem. Clin Infect Dis 2009;49(2):291-8
17. 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 1994;29:533.
18. Miller LA, Rittenhouse SF, Utrup LJ, Poupard JE. Comparison of three methods for determining of a single MIC of an antimicrobial agents. J Clin Microbiol 1994;32:1373.
19. Amsler K, Santoro C, Foleno B, Bush K, Flamm R. Comparison of broth microdilution, agar dilution, and Etest for susceptibility testing of doripenem against gram-negative and gram-positive pathogens. J Clin Microbiol 2010;48(9):3353-7.
20. Korten V, Söyletir G, Yalçın AN, Oğünç D, Dokuzoğuz B, Esener H et al. Comparative evaluation of in vitro activities of carbapenems against gram-negative pathogens: Turkish data of COMPACT study. Mikrobiyol Bul 2011;45(2):197-209.
21. Goyal K, Gautam V, Ray P. Doripenem vs meropenem against Pseudomonas and Acinetobacter. Indian J Med Microbiol 2012;30(3):350-1.