

# Kan Kültürlerinden Direkt Disk Difüzyon Yöntemi İle Yapılan Antibiyogramın Değerlendirilmesi

Çiğdem Kuzucu\*, Melek Ayan\*, Bengül Durmaz\*

\* İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Malatya

Bakteriyemide en kısa sürede etkenin izolasyonu ve antimikrobiklere duyarlılık sonuçlarının elde edilmesi tedaviye yön vermesi ve hastalık prognozu açısından son derece önemlidir. Antibiyotiklere duyarlılık sonuçları standart yöntemlerle 48 saatte saptanırken pozitif sinyal veren kan kültür şişesinden direkt yapılan duyarlılık testleriyle 24 saatte elde edilebilmektedir. Ancak direkt yapılan duyarlılık testleri henüz standardize edilmiş bir yöntem olmadığından çeşitli bakterilerle ve antibiyotiklerle yapılacak araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmada 200 pozitif kan kültüründen yapılan direkt disk difüzyon testi sonuçları ile standart disk difüzyon yöntemi sonuçları karşılaştırılmıştır. Yirmibir ayrı antibiyotik değerlendirilmiş ve her iki yöntem sonuçlarının %93.6 oranında uyumlu olduğu belirlenmiştir. Direkt difüzyon sonuçlarının %4.8'nin küçük hata, %0.9'nun büyük hata ve %0.5'nin çok büyük hata kategorilerine girdiği, büyük hata ve çok büyük hataların oksasilin, vankomisin, klindamisin, siprofloksasin ve gentamisin duyarlılığında olduğu saptanmıştır. Ayrıca duyarlılık kategorileri uyumlu olmakla beraber, bu iki yöntemle elde edilen inhibisyon zon çaplarında %58 oranında fark bulunmuştur.

Bakteriyemi olgularında etkin tedaviye kısa sürede başlanması için direkt disk difüzyon uygulaması ile antibiyogram yapılabilir. Fakat bu yöntemde az da olsa 'çok büyük hata' görülmesi esinden dolayı mutlaka standart duyarlılık testleri ile doğrulanması gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kan Kültürü, Standart Disk Difüzyon, Direkt Disk Difüzyon

## The Evaluation Of Antibigrams Obtained From Blood Cultures Using Direct Disk Diffusion

In bacteremia, rapid isolation of infectious agents and determination of their antibiotic susceptibility are very important for appropriate treatment decision. Although antibiotic susceptibility test results are determined in 48 hours by the standard method, direct susceptibility tests which are obtained from directly positive blood culture bottles can provide results in 24 hours. However, since direct susceptibility testing has not been standardized, there is need for further investigation with different microorganisms and antibiotics. In this study, the result of direct disk diffusion tests were compared with those of standard disk diffusion method in 200 positive blood cultures. A total of 21 different antibiotics were evaluated and the results of both methods had 93.6% agreement. There were 4.8% minor, 0.9% major and 0.5% very major discrepancies between the direct diffusion test and the standard method, and major and very major discrepancies were found to be associated mostly with oxacillin, vancomycin, clindamycin, ciprofloxacin and gentamicin. In addition, although the susceptibility categories were in agreement, there was a difference of 58% between the zonal diameters determined by both methods.

In bacteremia, direct disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing can be performed in order to start the effective treatment as soon as possible. However, even though very major discrepancies are observed infrequently, standard susceptibility tests should also be performed to confirm the test results.

**Key words:** Blood Culture, Standard Susceptibility Test, Direct Susceptibility Test

Bakteriyemi ve sepsis mortalitesi yüksek infeksiyonlar arasındadır. Bu infeksiyonların tedavisinde ucuz ve etkin tedavi seçimi için klinisyenin başlıca rehberi antibiyotiklere duyarlılık sonuçlarıdır. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarının kısa sürede ve doğru olarak rapor edilmesi ampirik tedavi protokolünde değişikliklerin zamanında yapılmasını ve tedavi maliyetinde azalmayı sağlayacaktır. Bakteriyeminin saptanması için otomatize kan kültür sistemlerinin kullanılması yaygın hale gelmiştir. Otomatize kan kültür sisteminde pozitif üreme sinyali alındıktan 48 saat sonra antibiyotik

duyarlılık sonuçları alınabilmektedir. Bu sürenin kısaltılması için otomatize kan kültür sistemlerinde pozitif üreme sinyali veren kan kültürlerinden direkt antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması tavsiye edilmektedir.<sup>1-3</sup> Böylece antibiyotik duyarlılık sonuçları 24 saat gibi kısa sürede verilebilmektedir.

Bu uygulamadan doğabilecek hataların değerlendirilmesi amacıyla çalışmamızda pozitif sinyal veren 200 kan kültüründe direkt antibiyogram ile alınan sonuçlar NCCLS'e göre yapılan disk difüzyon yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Haziran 2000–Şubat 2001 tarihleri arasında laboratuvarımıza gelen ve BacT/Alert cihazında pozitif üreme sinyali veren kan kültürleri değerlendirilmiştir. Kan kültürlerinden hazırlanan direkt preparatların metilen mavisi ve Gram yöntemi ile mikroskopik incelemesi yapılmıştır. Mikroskopisinde tek tip bakteri görülenler çalışmaya alınmıştır. Kan kültürlerinden kanlı agar ve eosin metilen blue (EMB) besiyerlerine pasaj yapılmıştır. Pasajlarında iki veya daha fazla bakteri, maya ve streptokok üremesi saptanan kan kültürleri çalışmadan çıkarılmıştır. Çalışmaya alınan kan kültür şişelerinden 0.5 ml, aynı hacimde beyin kalp infüzyon buyyona ekilip, 3-6 saat, 35 °C'de, aerop koşullarda inkübe edilmiştir. Buradan 0.5 ml alınıp steril distile suda McFarland 0.5'e ayarlanmış ve Mueller Hinton agarda Kirby-Bauer yöntemi ile disk difüzyon testi uygulanmıştır. Ayrıca aynı kan kültürlerinin pasajlarından üreyen bakterilere standart Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Gram negatif bakterilerin tiplendirilmeleri API 20E bakteri identifikasyon kiti ile yapılmıştır. Antibiyogramda kullanılan diskler, bakterilerin Gram boyanma özelliklerine göre seçilmiştir. Gram pozitif koklar için oksasilin (1µg), teikoplanin (30 µg), vankomisin (30 µg), eritromisin (15 µg), siprofloksasin (5 µg), penisilin G (10 Ünit), klindamisin (2 µg), trimetoprim-sülfome-toksazol (1,25 µg/23,75 µg), gentamisin (10 µg) diskleri kullanırken, Gram negatif bakteriler için ampisilin (10 µg), piperasilin (100 µg), amoksilin-klavulanat (20 µg/10 µg), seftriakson (30 µg), seftazidim (30 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (10 µg), sefalotin (30 µg), sefoksitin (30 µg), sefuroksim (30 µg), siprofloksasin (5 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), aztreonam (30 µg), trimetoprim-sülfametoksazol (1,25 µg/23.75 µg) kullanılmıştır.

NCCLS'de (National Committee for Clinical Laboratory Standards) belirtilen kriterlere göre, duyarlılık profilleri değerlendirilip, iki yöntem arasındaki sonuçlar uyumlu, küçük hata (direkt yöntemde orta duyarlı iken standart yöntemle duyarlı veya dirençli olması veya bunun tersi olması), büyük hata (direkt yöntemde dirençli iken standart yöntemle duyarlı olması) ve çok büyük hata (direkt yöntemde duyarlı iken standart yöntemle dirençli olması) kategorilerine ayrılmıştır. Ayrıca iki yöntem arasındaki disk zon çapı farklılıkları <6 mm, 6-10 mm, 11-15 mm, 16-20 mm, ≥21 mm olarak gruplara ayrılmıştır.<sup>4</sup>

## BULGULAR

Çalışmaya alınan 200 kan kültüründen izole edilen bakteriler Tablo 1'de gösterilmiştir. Bu bakterilerin antibiyotiklere duyarlılık sonuçlarının her iki yöntemle %93.6 oranında uyumlu olduğu belirlenmiştir. Direkt difüzyon sonuçlarının %4.8'nin küçük hata, %0.9'nun

**Tablo 1.** Çalışmaya alınan kan kültüründe üreyen bakteriler ve sayıları

Bakteriler	Sayı
Gram pozitif bakteriler	100
Metisilin duyarlı koagulaz negatif stafilokoklar	22
Metisilin dirençli koagulaz negatif stafilokoklar	50
Metisilin duyarlı Staphylococcus aureus	20
Metisilin dirençli Staphylococcus aureus	8
Gram negatif bakteriler	100
Escherichia coli	33
Klebsiella oxytoca	18
Klebsiella pneumoniae	6
Acinetobacter baumannii	10
Salmonella spp	15
Pseudomonas aeruginosa	7
Enterobacter cloacae	6
Enterobacter aerogenes	3
Stenotrophomonas maltophilia	2
<b>TOPLAM</b>	<b>200</b>

## Kan Kültürlerinden Direkt Disk Difüzyon Yöntemi İle Yapılan Antibiyogramın Değerlendirilmesi

büyük hata ve %0,5'nin çok büyük hata kategorilerine girdiği, büyük hata ve çok büyük hataların OX, VA, DA, CİP, GN duyarlılığında olduğu saptanmıştır (Tablo 2). Ayrıca duyarlılık kategorileri uyumlu olmakla beraber, bu iki yöntemle elde edilen zon çapları

karşılaştırıldığında ortalama %58 oranında farklılık olduğu ve bu farkın çeşitli antibiyotik disklerine göre %23-72 arasında değiştiği bulunmuştur (Tablo 3).

**Tablo 2.** İki ayrı yöntemle alınan duyarlılık sonuçlarının uyumu

Antibiyotik (test sayısı)	Uyumlu %	Küçük hata %	Büyük hata %	Çok büyük hata %
OX (100)	94	3	1	2
TEC (100)	86	13	1	-
VA (100)	94	4	2	-
P (100)	98	1	1	-
E (100)	95	4	-	1
DA (100)	92	4	2	2
CİP (200)	96	1.5	1	1.5
SXT (200)	98	1.5	0.5	-
GN (200)	88	8	1.5	2.5
AMP (100)	96	3	1	-
PRL (100)	96	3	-	1
AMC (100)	93	5	2	-
CRO (100)	92	7	-	1
CAZ (100)	87	10	2	1
AK (100)	92	7	1	-
KF (100)	92	5	3	-
FOX (100)	96	4	-	-
CXM (100)	92	7	1	-
İMP (68)	97	2.9	-	-
MEM (100)	97	3	-	-
ATM (100)	96	4	-	-
TOPLAM (2368)	93.6	4.8	0.9	0.5

Oksasilin (OX), teikoplanin (TEC), vankomisin (VA), eritromisin (E), siprofloksasin (CİP), penisilin G (P), klindamisin (DA), trimetoprim-sülfometoksazol (SXT), gentamisin (GN), ampisilin (AMP), piperasilin (PRL), amoksisilin-klavulanat (AMC), seftriakson (CRO), seftazidim (CAZ), amikasin (AK), sefalotin (KF), sefoksitin (FOX), sefuroksim (CXM), imipenem (İMP), meropenem (MEM), aztreonam (ATM)

**Tablo 3.** Direkt ve standart yöntemle yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde inhibisyon zon çaplarında gözlenen farklılıklar

Antibiyotik (test sayısı)	Gruplar*					
	Aynı %	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %
OX (100)	57	39	2	2	-	-
TEC (100)	25	70	5	-	-	-
VA (100)	26	71	3	-	-	-
P (100)	38	50	11	2	-	-
E (100)	55	40	3	2	-	-
DA (100)	52	42	4	-	2	1
CİP (200)	29	59	7	5	-	-
SXT (200)	46	48.5	4.5	1	-	-
GN (200)	29	61	7	2.5	0.5	-
AMP (100)	72	25	3	-	-	-
PRL (100)	41	52	7	-	-	-
AMC (100)	47	45	5	2	1	-
CRO (100)	53	42	3	2	-	-
CAZ (100)	34	62	4	-	-	-
AK (100)	23	72	4	1	-	-
KF (100)	53	44	3	-	-	-
FOX (100)	45	50	5	-	-	-
CXM (100)	58	38	4	-	-	-
İMP (68)	38.2	58.8	2.9	-	-	-
MEM (100)	28	72	-	-	-	-
ATM (100)	31	63	5	1	-	-
TOPLAM (2368)	42	52.5	4.4	0.9	0.1	0

\* Direkt ve Kirby-Bauer yöntemiyle yapılan antibiyotik duyarlılık sonuçlarının inhibisyon zon çap farklılıklarına göre gruplandırılması: Aynı: Her iki metodla sonuçlar uyumlu, 1. grup: <6 mm, 2. grup: 6-10 mm, 3. grup: 11-15 mm, 4. grup: 16-20 mm, 5. grup: ≥21 mm sapma olanlar

## TARTIŞMA

Bakteriyemi yoğun bakım ünitelerinde mortalite ve morbiditenin en önemli sebebi olup sıklığı gün geçtikçe artmaktadır. Tedavideki başarı oranını artırmak için etken en kısa sürede tanımlanıp antibiyogram sonuçları kliniğe iletilmelidir. Bakteriyemi etkenlerinin tespiti için otomatik kan kültür sistemleri ve hızlı identifikasyon sistemleri geliştirilmiştir. Laboratuvarımızda bu amaçla kullanılan BacT/Alert kan kültür sisteminden pozitif sinyal alındıktan en az 48 saat sonra Kirby- Bauer yöntemi ile antibiyogram sonuçları çıkmaktadır. Antibiyogram sonuçlarının elde edilme süresini daha da kısaltmak için tam bir standardizasyon sağlanamamasına rağmen bakteri saf-laştırılmadan direkt olarak disk difüzyon yöntemleri de yapılabilmektedir. Ancak antibiyotik duyarlılık test sonuçları, inokulum miktarı, bakterinin üreme fazı, besiyeri kalınlığı, besiyeri pH'sı, tuz konsantrasyonu, ortamdaki kan ürünleri gibi birçok faktörlerden etkilenmektedir.<sup>5, 6</sup> Bu nedenle önerilen direkt disk difüzyon yöntemi sonuçları ile standart disk difüzyon sonuçları arasında uyumsuz sonuçlar olmaktadır. İkiyüz bakteri için her iki yöntemle yaptığımız antibiyotik duyarlılık test sonuçları, %93.6 uyumlu, %4.8 küçük hata, %0.9 büyük hata, %0.5 çok büyük hatalı bulunmuştur. Çok büyük hataların OX, DA, CİP ve GN'de olduğu tespit edilmiştir. Gülay ve ark. yaptıkları çalışmada, sonuçların %92'sini uyumlu bulurken, %6.5 küçük hata, %1 büyük hata, %0.5 çok büyük hata bulunmuş, uyumsuz sonuçlar özellikle oksasilin, amikasin, sulbaktam-ampisilin ve amoksisilin-klavulanat antibiyotiklerinde görülmüştür.<sup>4</sup> Mirrette ve ark.<sup>1</sup> sonuçların %94.6'sını uyumlu bulurken, %5.2 küçük hata, %0.3 büyük hata bildirilmişlerdir. Fay ve ark.<sup>7</sup> direkt difüzyon ve standartize yöntem arasında %94.6 uyum, %4.5 küçük hata ve %0.9 büyük hata bildirmişlerdir. Coyle ve ark. yaptıkları çalışmada direkt disk difüzyon test sonuçlarını 4 saat, 6 saat ve bir gece inkübasyondan sonra değerlendirmiş ve standart yöntemle karşılaştırmışlardır. Dört saat sonra %3.5, 6 saat sonra %0.6 ve bir gecelik inkübasyondan sonra %0.7 oranında büyük hata gözlemişler ve büyük hataların %1'den az olması nedeniyle 6 saatlik inkübasyondan sonra okunan sonuçları daha uygun bulmuşlardır.<sup>8</sup> Nolte ve ark.'nın yaptığı çalışmada direkt ve standart disk

difüzyon yöntemleri arasında %93.5 uyum, %2.2 çok büyük hata, %1.8 büyük hata ve %7.8 küçük hata bulunmuştur.<sup>9</sup>

Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında yüksek oranda uyum olmasına rağmen zon çaplarında yüksek oranda farklılıklar tespit edilmiştir. Antibiyotikler %42 oranında aynı zon çapına sahipken, %58'nin zon çapları farklı bulunmuş fakat bu farklı zon çapları duyarlılık kategorilerini değiştirmemiştir. Gülay ve ark. yaptıkları çalışmada zon çaplarının değerlendirilmesinde %61.5 oranında aynı gruba dahil zon çapı ölçmüştür.<sup>4</sup>

Sonuç olarak bakteriyemide etkin ve başarılı tedavi için antibiyogram test sonuçları en kısa sürede verilmelidir. Pozitif sinyal alınan kan kültürlerinden direkt yapılan disk difüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar, standart yöntemle yüksek oranda uyum gösterdiğinden dolayı klinisyene ön bilgi olarak bu sonuçlar verilebilir. Ancak düşük de olsa hatalı sonuçlar olabileceğinden mutlaka standartize edilmiş yöntemlerle antibiyogram yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Mirrett S, Reller LB. Comparison of direct and standard antimicrobial disk susceptibility testing for bacteria isolated from blood. *J Clin Microbiol* 1979; 10: 482-7.
2. Mirrett S. Antimicrobial susceptibility testing and blood cultures. *Clin Lab Med* 1994; 14:171-9.
3. Trenholme GM, Kaplan RL, Karakusis PH, Stine T, Fuhrer J. Clinical impact of rapid identification and susceptibility testing of bacterial blood culture isolates. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1342-5.
4. Gülay Z, Atay T, Öktem M A, Yuluğ N. Kan kültürü üremelerinde direkt disk difüzyon testi uygulamasının değerlendirilmesi. *ANKEM Dergisi* 2000;14: 85-91.
5. Woods GL. In vitro testing of antimicrobial agents. *Infect Dis Clin North Am.* 1995;9: 463-81.
6. Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Tümbay E, Mete Ö (editör). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. 1<sup>th</sup> baskı. Güneş Kitabevi. Ankara : 1999: 91-108.
7. Fay D, Oldfather JE. Standardization of direct susceptibility test for blood cultures. *J Clin Microbiol* 1979; 9: 347-50.
8. Coyle MB, McGonagle LA, Plorde JJ, Clausen CR, Schoenknecht F. Rapid antimicrobial susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation and early reading of disk diffusion tests. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 96-8.
9. Nolte FS, Contestable PB, Lincalis D, Punsalang A, Jr. Rapid, direct antibiotic susceptibility testing of blood culture isolates using the Abbott Advantage system. *Am J Clin Pathol* 1986; 86: 665-9.

### Yazışma adresi:

Dr.Çiğdem Kuzucu. İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD  
44069 MALATYA  
Tel: 422 341 0660/4823.