

ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ VE UYGULAMA ALANLARI

Jale ERDEĞER (*)

Patolojik materyallerden izole edilen, bir infeksiyöz hastalık etkeni olan mikroorganizmaların, antibiyotiklere duyarlılığını incelemeye veya bu duyarlılığın araştırılması amacıyla yapılan işleme antibiogram denir.

Vücuda giren ve hastalık etkeni olan organizmalar çok çeşitli olduğu için, kemoterapide kullanılan kimyasal maddeler de o ölçüde çeşitlilik gösterir. Organizmanın yapısını oluşturan canlı hücreler, mikroorganizmalar gibi seçici geçirgen bir zara, benzer yapıda sitoplazmaya ve metabolizmalarını sağlayan, mikroorganizmalarinkine benzer enzimlere sahiptirler. Bu durumda bir kemoterapötik maddenin seçiminde, mikroorganizmayla organizma arasında seçici toksik olma özelliğini gözönünde tutmak gerekir. Bahsedilen seçici toksik olma özelliği, mikroorganizma hücresiyle, memeli hayvan hücresi arasındaki yapı ve kimyasal mekanizmalar yönünden var olan farklar sayesinde ortaya çıkar. Bugün birçok antimikrobial ilaç bulunmasına karşın, ancak çok azı insan ve hayvan hastalıklarında kullanılmaktadır. Bunların bir kısmı konakçı organizması için toksik veya irritan bir özelliğe sahip olduğundan, klinikte yararlanma olanağı yoktur. Bu nedenle, antimikrobial maddelerin terapötik indeksinin çok iyi hesaplanması gerekir.

Antibiyotikler pratikte çok kullanılan, değişik mikroorganizmalar ve mantarlar tarafından sentezlenen, sentetik ve yarı sentetik antimikrobial kimyasal maddelerdir. Antibiyotiklerin mikroorganizma cinsleri ve türlerine, hatta aynı etkenin değişik suşlarına, değişik biçim-

(*) Araş. Gör., A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Bakteriyoloji Bilim Dalı

de etki göstermesi sonucu, söz konusu etkenin, antibiyotiklere karşı duyarlılığının saptanması gerekmektedir. Genellikle hangi antibiyotiklerin, hangi bakterilere etkin olduğu saptanmışsa da, zamanla bakterilerin direnç kazandıkları bilinmektedir. Bu nedenle de antibiyotik duyarlılık testlerinin yapımı zorunlu hale gelmiştir.

Kemoterapötik maddelerin bakteriler üzerindeki etkileri değişiktir. Bu etkiler, yoğun konsantrasyonlarda öldürücü (bakterisid), az yoğun konsantrasyonlarda ise üremelerini durdurucu (bakteriostatik) etkilidir. Antibiyotiklerin bakteriler üzerinde: 1 — Hücre duvarı sentezinin bozulması veya inhibe edilmesi, 2 — Sitoplazmik membran sentezinin inhibe edilmesi, 3 — Protein sentezinin engellenmesi, 4 — Nükleik asit fonksiyon ve sentezinin bozulması veya engellenmesi, 5 — Metabolik antagonistik etki, gibi aktiviteleri olduğu bilinmektedir.

Bu tür ilaçlara maruz kalan bakteri popülasyonları arasında karşılaşılan rezistans olgusu, insan ve veteriner hekimliğinde en fazla dikkat edilmesi gerekli sorunlardan biridir. İlaç rezistansı (direnci), belli bir kemoterapötik ilacın etkisi altında, benzer hücrelerin üremesinin durduğu, tahrip olduğu veya inhibe edildiği koşullarda üreme kapasitesine sahip olabilmektir. Diğer bir anlatımla, mikroorganizmaların özellikle bir kemoterapötik ilaca karşı duyarsızlaşmasına rezistans adı verilir. Bir kemoterapötik ilaca karşı rezistans olan mikroorganizma türü, değişik gruptan diğer bir kemoterapötiğe karşı duyarlı olabilir. Ancak, benzer kimyasal yapıya sahip kemoterapötikler için durum aynı değildir. Örnk.: Penisiline direnç kazanan bir bakteri türü, yapısında betalaktam halkasını içeren, penisilin analogu diğer bileşiklere karşı da rezistans kazanabilir (Çapraz rezistans).

İlaç rezistansı doğal ya da kazanılmış bir özellik gösterebilir. Doğal rezistans, mikroorganizmanın bir kemoterapötiğe maruz kalıp kalmadığı dikkate alınmaksızın, türler veya suşlarda intrinsik bir olgu olarak ortaya çıkar. Bütün kemoterapötik ilaçlar aynı etki spektrumuna sahip olmadıkları için, mikroorganizmaların farklı kemoterapötiklere farklı duyarlılık göstermeleri veya tümüyle duyarsız olmaları doğaldır. Bu durum genetik yapı ve metabolik süreçlerle yakından ilgilidir. Kazanılmış rezistans, bir mikroorganizmanın invitro veya invivo olarak, bir ilaca maruz kalması sonucunda şekillenir. Kazanılmış rezistansta, bakterinin kemoterapötik ilaç ile ilk temas gelişinde, ilaç bakteri üzerine etkilidir, ancak temas süresi boyunca

veya tekrarlanan temaslarda bakteri, ilacın antibakteriyel etkisine karşı rezistans gelişir.

Sağaltım sırasında oluşan dirençli suşların antibiyotik uygulaması ve kombinasyonu bakımından önemi çok fazladır. Antibiyotiklerin yeterli miktarda ve sürede alınmaması, uygun olanın seçilmemesi dirençliliği hazırlayıcı faktörler arasındadır. Başlıca dirençlilik türleri: 1 — Antibiyotiklerin tahribi, 2 — Permiabilite azalması, 3 — Kompetatif inhibisyon, 4 — Mutasyon, 5 — Ribozomal direnç, 6 — İlaç aktivitesinde azalma, 7 — Antagonist madde sentezi'dir.

İki antibiyotik birleştirildiğinde başlıca 5 türlü etki görülebilir; 1 — Sinergetik (aynı yönde) etki, 2 — Additif (ilave) etki, 3 — İnterferens etki, 4 — Etki potensinin artması (potansiyalizasyon), 5 — Antagonist (zıt) etki.

Bir infeksiyonun sağaltımında, infeksiyondan sorumlu mikroorganizmanın identifikasyonu ve uygun antibiyotiklerin seçimi bazı özellikler gösterir. (Tablo 1). Bu özellikler değişkenlik gösterir. Bunlar;

— Bazı bakteri türleri çok heterojen olup, antibiyotiklere dirençlilik ve duyarlılıkları çeşitli derecelerde değişen suşları içererek, doğal bir dirençlilik gösterirler. Örn.: Stafilokoklar, bazı streptokoklar (viridans, faecalis), koliformlar.

— Bazı suşlar tedavi sonrasında dirençlilik kazanırlar. Örn.: Streptomisinle uzun süren tedavide veya üriner infeksiyonlarda kısa tedavide.

— Poliinfeksiyon durumlarında invitro inceleme gerekmektedir. Değişik antibiyotiklere, değişik bakterilerin duyarlılığı polivalan bir şekilde incelenmelidir.

Ayrıca bir antibiyotiğin seçiminde düşünülmesi gereken önemli konular;

— Uygun antibiyotiğe karşı, infekte eden organizmanın tabiatında var olan invitro duyarlılığın bilinmesi,

— Aynı türün diğer suşları arasındaki duyarlılık ilişkilerinin bilinmesi,

— Özellikle hepatik ve renal yetmezlik durumlarında, antibiyotiğin toksisite, protein bağlama, vücutta yayılım, absorpsiyon ve vücuttan atılım gibi farmakolojik özelliklerin bilinmesi,

— Aynı türün sebep olduğu infeksiyonların sağaltımında etkili, ciddi klinik deneylerin gözönünde bulundurulması,

— Doğuştan var olan patolojik sürecin bilinmesi, onun daha önceki durumunun ve kemoterapiye etkisinin bilinmesi,

— Konakçının immun durumunun gözönünde bulundurulmasıdır.

Bütün bu faktörler, organizmaların invitro inhibe edilmeleri veya öldürülmeleri ve tedavi boyunca, vücut sıvılarında belli konsantrasyonlarda bulunmaları için ihtiyaç duyulan, antimikrobial ilaç konsantrasyonlarının, klinik laboratuvarlarında ölçümüne neden olurlar.

Bu konuyla ilgili olarak kurulmuş sorumlu laboratuvarlar, sorun olan organizmaya karşı etkili, uygun antibiyotiğin aktivitesinin standarde invivo testlerle saptanmasına çalışılmakta ve bilgi sağlanmaktadır.

AEROB BAKTERİLERİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

1 — Dilüsyon (Sulandırma) Metodu

A — Agar (Katı ortamda) Dilüsyon Testi

- Nokta ekim yöntemi
- Çizgi yöntemi
- Szybalski Gradient (Plak) yöntemi
- Fleming agar kanal yöntemi

B — Broth (Sıvı ortamda) Dilüsyon Testi

- Mikrodilüsyon yöntemi
- Makrodilüsyon yöntemi

2 — Diffüzyon (Yayınma) Metodu

A — Kirby Bauer Disk Diffüzyon Testi

B — Agar Overlay Metodu

1 — DİLÜSYON (SULANDIRMA) METODU

Dilüsyon testleri, mikroorganizmaları öldürmek veya üremelerini inhibe etmek için, ihtiyaç duyulan antimikrobial ajanların (antibiyotiklerin) minimal konsantrasyonlarını (MIC) tayin etmek için kullanılır.

lan metottur. Antibiyotiklerin seri dilüsyonlarına organizmaların inokule edilmesi ve inkubasyonu ile elde edilir. MIC (Minimal inhibisyon konsantrasyonu) mikroorganizmada üremenin görülmeyişi, en düşük antibiyotik konsantrasyonudur. Bu test iki yöntemle yapılabilir:

1 — Agar (Katı ortamda) Dilüsyon Testi

2 — Broth (Sıvı ortamda) Dilüsyon Testi

Agar (veya plate) ve sıvı (veya tüp) terimlerine, katı besiyerinde ve sıvı besiyerinde yapılan testleri belirtmek için «dilüsyon test» terimi eklenmiştir. Her iki terim gerçekte yanlış kullanılmıştır. Çünkü dilüe edilen, agar veya sıvı değil, antimikrobial ilaçtır.

Çok duyarlı olan bu teknik, uzun maniplasyonları gerektirmekte ve sistematik incelemelerde kullanılmaktadır.

- Yeni bir antibiyotiğin aktivite spektrumu,
- Bakteri tür ve cinslerinin birçok antibiyotiğe duyarlılığını,
- Değişik ülkeler ve zamanlardaki bir türün duyarlılık değişimini,
- Antibiyotiklerin kötü yayılımını,
- Yavaş üreyen bakterilerin duyarlılığını, özel besiyerlerinde, bulanıklık veya üreme inhibisyonu ile ortaya koyar.

Antibiyotik duyarlılık testi için, daha kantitatif bir metot olan dilüsyon testi, temel olarak International Collaborative Study Recommendations veya NCCLS standartlarından alınan dilüsyon testlerinden biridir. Bu testler özellikle organizmaların üreme oranlarından etkilenmeyen ve antimikrobial ilaçların diffüzyon güçlükleri olmayan direk kantitatif sonuçlar verir. Dilüsyon testleri, diffüzyon testlerinin esnekliğine sahip değildir. Genellikle klinik materyallerin direk testleri için kullanılmaz, çünkü kontaminasyonu saptamak güçtür. Dilüsyon testleri, antimikrobial terapinin, uygulamadaki doğruluğunu saptamak için zorunlu olduğunda, kantitatif bilgi sağlamak amacıyla yapılabilir. Kalitatif bilgi, genelde birçok infeksiyonun tedavisinde yol göstermek için tatmin edicidir. Kantitatif bilgiye, serumdaki ilaç doz seviyeleri birbirine yakın olarak gözlemlendiğinde veya disk testleri uygulanmadığından, sonuçların şüpheli veya güvenilmez olduğu durumlarda ihtiyaç duyulabilir. Yavaş üreyen organiz-

malarda polymxinlere karşı duyarlılığın, aminoglycosidlere (özellikle gentamicin, tobramycin, amikacin) karşı direncin saptanması ve disk diffüzyon testleri ile orta derecede duyarlı veya şüpheli sonuçlar meydana getiren, muhtemelen toksik, ancak klinik olarak faydalı antibiyotiklerin testleri için kullanılabilir. Dilüsyon metodları içinde, uygulanan diğer önemli testlerden biri anaerobların duyarlılık testleridir. Önem taşıyan anaerob mikroorganizmalara karşı antagonizm veya sinergizmin saptanması veya bakterisidal aktivitenin tayin edilmesi için yapılmaktadır. Sonuçta, dilüsyon testlerinin rutinde kullanımı, agar dilüsyon veya yarı otomatikleştirilmiş mikrodilüsyon tekniklerinden dolayı ekonomik ve pratik bulunmuştur.

Dilüsyon teknikleri, yukarıdaki geçerliliğine karşın bazı sakıncaları içermektedir. Bunlar:

- Standart diffüzyon yöntemlerine oranla daha fazla beceri ve dikkat isterler,
- Kemoterapötiklerin elle doldurulması ve sulandırılması hataların kaynağını oluşturur.
- Kontaminasyonun kontrol edilmesi ve ölçülmesi zordur,
- Direnç değişim aralığı çok yaygın olduğundan MIC'nun belirlenmesi zordur,
- Ekim miktarındaki değişikliklerin MIC'nu etkilemesi,

— MIC değerleri yaygın olduğundan, toksik ve sağaltıcı değer sınırları yakın olan antibiyotikler için önemli bir problemdir.

A — AGAR (KATI ORTAMDA) DİLÜSYON TESTİ

1 — NOKTA EKİM YÖNTEMİ

Agar dilüsyon metodu, birçok suşun testi için uygun olduğundan, mikrobiyal kontaminasyonu saptama olasılığından ve sıvı dilüsyon metodundan biraz daha üretken sonuçlar alındığı için tercih edilmektedir.

Antibiyotik dilüsyonlarının hazırlanması : Antibiyotik dilüsyonları, final testte arzu edilen titrenin 10 katı daha fazla bir titrede stok solüsyondan hazırlanır. MIC saptanmasında 2 katlı (\log_2) dilüsyonlar

kullanılmaktadır. Değerlerin \log_2 olarak ifade edilmesi, istatistiksel manipulasyonları kolaylaştırır.

Besiyerinin seçimi ve hazırlanması : Çabuk olarak üreyen aerobik ve fakültatif anaerobik bakteriler için Müeller-Hinton agar önerilmiştir. Bu besiyerine, bazı zor üreyen bakteriyel patojenlerin üremesinden emin olmak için % 5 defibrine koyun, at veya diğer hayvan kanlarının eklenmesi gerekli görülmüştür. Müeller-Hinton agara kan ilavesi nafcillin veya novobiocin gibi yüksek derecede protein bağlı kemoterapötikler hariç diğerlerinin test sonuçlarına etkisinin çok az olduğu saptanmıştır. Trimethoprim veya sülfonamidlerin aktivitesi, lize at kanı hariç, tüm kan komponentleri tarafından antagonize edilmektedir. Rutinde Müeller-Hinton agara kan ilavesi zorunlu değildir. Ancak streptokoklar için defibrine kan ve haemophilus türlerinin testi için Ico Vital X veya Vx her bir final konsantrasyonda % 1 oranında kullanılabilir. Neisseria meningitidis testlerinde Müeller-Hinton agara kan ilave edilmediğinden sonuçlar tatmin edici bulunduğu halde, Neisseria gonorrhoeae'nın GC (Difco) temel besiyerindeki testlerinde % 5 koyun kanı gerekli bulunmuştur.

Besiyerinin uygun miktarları (100 mm'lik petrilere 25 ml. agar) vida kapaklı şişelere konular ve otoklavlanır. Besiyeri ısı su banyosunda 50°C'ye ayarlanır (Daha yüksek ısıda antibiyotik ilavesi, bozulmaya neden olur, daha düşük ısıda ilave ise, yeterli karışıma engel olacaktır). Defibrine kan besiyerine antibiyotik ilave edilip, iyice karıştıktan sonra katılabilir. Besiyerinin pH'ı 7,2 - 7,4 olmalıdır.

Referans çalışma için, antibiyotiğin her bir dilüsyonunun 1 volumü, agarın her bir 9 volumüne eklenir. Örn.: 128 µg/ml final konsantrasyona 90 ml agara, 1,280 µg/ml'lik solusyondan 10 ml eklenecek ulaşılabilir. Kap içindekinin tamamen karıştırılması ve petri kutularına agarın hızlı olarak dökülmesi gerekir. (Kısmi katılma ve soğuma önlenmelidir). Kontroller antibiyotik içermeyen, defibrine koyun kanlı ve kansız olarak hazırlanmaktadır. Besiyerleri 4°C'de saklanmalıdır. Ryan ve arkadaşları 1 hafta 4°C'de saklanmış agarda, antibiyotik dilüsyonlarının aktivitelerinde bir düşme olmadığını göstermiştir. Referans çalışmaları için 24 saatten daha uzun süre saklanmamış besiyerlerinin kullanılması arzu edilir.

İnokulum hazırlanması : Testi yapılan organizma numunesinin benzer 4 veya 5 kolonisi Soybean-casein digest (Trypticase soy broth

veya tryptic soy broth) gibi 4-5 ml. uygun bir sıvı besiyerine inokule edilir. Üreme sonunda barium sulfat standardının yoğunluğuna ayarlanır. Bu yoğunluk *Pseudomonas aeruginosa* için yaklaşık olarak 1×10^8 — 5×10^8 ve *Enterobacteriaceae* familyası için 5×10^7 CFU/ml'ye eşittir. Daha sonra hazırlanmış antibiyotikli agarı inokülasyon için, tuzlu su veya Müeller-Hinton broth içinde 1:20 dilüsyonu hazırlanır. İnokülasyon inokulum hazırlandıktan 30 dk. içinde yapılmalıdır.

Besiyerinin inokülasyonu : İnokulum antibiyotik içeren besiyerleri ve antibiyotik içermeyen kontrollerin agar yüzeyine 0.001 - 0.002 ml. bırakmak için ayarlanmış öze veya steers replikatörü ile nokta şeklinde inokule edilir. Antibiyotiklerin en düşük konsantrasyonunu içeren petripler ilk önce, kontroller en son ekilmelidir.

İnkubasyon : İnokule edilen petriplerde, inokulum noktaları tam olarak absorbe oluncaya kadar bekletilir. Sonra 35°C'de 16-20 saat inkube edilir. CO₂'li atmosferde inkube edilmez. Bu çeşitli antibiyotiklerde yüzey pH'ına etkilidir.

Kontroller : Petri kutularının her bir setine kontrol olarak saptanmış suşlar inokule edilir. Kontrol suşların herbiri için çeşitli antibiyotiklerin MIC değerleri saptanmıştır. MIC'lerinin en az % 95'i bu değerler içinde olmalıdır. Bu değerlerden önemli sapmalar, kontrol organizmalarının kontaminasyonu veya metotta mümkün olabilecek hataları dikkatlice araştırmayı gerektirir.

Sonuçlar : MIC, test edilen organizmada tam inhibisyon meydana getiren, antibiyotiğin en düşük konsantrasyonunu ifade eder. Bu arada belirsiz olarak görülen veya tek koloni üremesi önemsizdir. MIC noktası üremenin birdenbire (% 80-90) eksilme gösterdiği petri olarak alınmalıdır.

2 — ÇİZGİ YÖNTEMİ

Arzu edilen final titrenin 10 katı fazla bir titrede bir antibiyotik serisi hazırlanır. Örn.: 8 µg'dan 1000 µg'a kadar. Herbir dilüsyondan 18 ml. agara 2 ml. konularak, 0.8 µg'dan 100 µg/ml'e kadar konsantrasyonlar hazırlanır. Bu şekilde hazırlanan agarlar, petri kutularına dökülerek, antibiyotik içermeyen bir petri kutusu da kontrol olarak bırakılır.

İncelenmesi istenilen bakterinin, 24 saatlik buyyon kültürlerinin 1/1000'lik dilüsyonları hazırlandıktan sonra, 5 mm aralık ile 25 mm

uzunlukta, paralel çizgiler agar üzerine çizilir. Genellikle 2 kolon halinde 8 çizgiden, 16 deneme bir petride gerçekleştirilir. Ekim, 2 mm çapında standart bir öze ile yapılabildiği gibi, Heatley pipeti denilen, ince uçlu ve ucunun 1 cm'si 45° eğilmiş pastör pipetleri ile de yapılabilir ve kapillarite özelliğinden yararlanır. 18-24 saat inkübasyondan sonra, kolonilerin sayısı kontrolle karşılaştırılarak karar verilir.

3 — SZYBALSKI GRADİENT (PLAK) YÖNTEMİ

Bu metotta, nutrient agar bir petri kutusuna döküldükten sonra, hafif eğik tutularak, iki ucu arasında 1 cm'lik bir farklılık sağlanır. Soğuduktan sonra, bilinen antibiyotik konsantrasyonunu içeren, eşit miktardaki agar üzerine akıtılır. Birkaç saat sonra o eğimle, yüksek agar arasında antibiyotik konsantrasyon farklılığı meydana gelir ve üzerine çizgi halinde ekim yapılır. Sonuçlar ekim hattındaki üremeye göre değerlendirilir.

4 — FLEMİNG'İN AGAR KANAL METODU

Bir antibiyotik içeren agar petri kutusuna dökülür. Buzlukta 48 saat bekletildikten sonra, petri kutusunun kenarındaki oluktan, tekrar antibiyotik konsantrasyonları bırakılır. Daha sonra suşlar bu oluğa dik olarak ekilir. 24 saat sonra oluşan zonlar değerlendirilir.

B — BROTH (SIVI ORTAMDA) DİLÜSYON TESTİ

Sıvı ortamda dilüsyon antibiyotik duyarlılık testleri agar dilüsyon metodunun yerine geçen küçük bir modifikasyonudur. Bazı özellikleri sıvı dilüsyon metoduna özgüdür.

1 — MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ

Klinik Laboratuvar Standartları Uluslararası Komitesi, International Colloborative Study raporlarında öne sürülen standartları izleyerek, dilüsyon metodları için deneysel bir standart kurarak yayınlamıştır.

Dilüsyonların hazırlanması ve besiyerleri : Dilüsyonları hazırlamada 1 üniteden (1 µg/ml) 2 katlı sulandırma serileri veya 1/2 dilüsyon aralıkları tercih edilir. Testin yapımında, fakültatif anaerobların hızlı üremesi için Mg²⁺ ve Ca²⁺ gibi divalent katyonlu, sıvı Müeller-Hinton besiyeri tavsiye edilmiştir. Divalent katyonlu besiyerinin

Pseudomonas aeruginosa testi, aminoglikosidler, tetrasiklin ve polimiksinlerin MIC'ları üzerine etkisi büyüktür.

Platelerin inokülasyonu : Aktif olarak üreyen sıvı kültürler, Mc Ferland 0.5 yoğunluğuna ayarlanır ve istenilen inokulumu hazırlamak için dilüe edilirler. Son inokulum yaklaşık olarak 5×10^5 CFU/ml olmalıdır. Antibiyotik solüsyonu inokulumla 1/2 dilüe edileceği için, son konsantrasyon orjinal olarak hazırlananın yarısı kadar olacaktır. Plate gözleri plastik veya metal inokulum replikatörleri ile 100 µl antimikrobal ilaç ve 5 µl standardize inokulum ile doldurulur. İnokulum konsantrasyonundaki değişikliklerin test sonuçları üzerine etkisi büyüktür.

Platelerin inkübasyonu : İnokule edilen mikrodilüsyon plateleri, buharlaşmayı en aza indirmek için bir bantla kapatılır. Platelere plastik veya diğer kaplara yerleştirilir, üstleri kapatılır. Her bir kabın dibine ıslak havlu konularak, küçük nemli bir odada 35°C'de 16-20 saat inkübasyona bırakılır. Aşırı nemden kaçınılmalıdır. Nem platelerin yüzeyinde yoğunlaştığında kontaminasyona neden olabilir.

Sonuçların değerlendirilmesi : Platelere yukarıdan bakılarak değerlendirilebileceği gibi, sonuçlar yarı otomatik veya otomatik aletlerle de okunabilir. MIC noktası, görünür bir üreme olmayan, en düşük ilaç konsantrasyonudur. Üreme kriteri, mikroorganizmanın düğme şeklindeki sedimentidir. Bu 2 mm veya daha büyük çapta olabilir. MIC değerlendirilmesinde, her bir platede kullanılan üreme kontrolündeki mikroorganizmaların üreme karakterleri ile, plate gözlerindeki diğer üremelerin karşılaştırılmasının gözönüne alınması önemlidir. MIC tayini, açık veya az yoğun çukura karşı, yoğun çukuru okuyarak kolaylıkla yapılabilir.

2 — MAKRODİLÜSYON YÖNTEMİ

Dilüsyonların hazırlanması : Antibiyotik solüsyonları, Müeller-Hinton sıvı besiyerinde dilüe edilen ilaçlar ile hazırlanmışlardır. Steril test tüplerinde, antibiyotiğin 2 katlı dilüsyonları hazırlanır. Sulandırma serisi için 1. test tüpü içine antibiyotiğin hazırlanan solüsyonundan 2 ml. konulur. Eldeki her bir tüpe 1 ml. Müeller-Hinton sıvı besiyeri konulur. Steril pipetle 1. tüpten 2. tüpe 1 ml. aktarılır. Son tüpten bir öncekine kadar bu işlem yapılır ve 1 ml. alınarak uzaklaştırılır. Son tüp antibiyotik almaz ve üreme kontrolü olarak kullanılır. Bu

testte antimikrobal ilacın son konsantrasyonu, ilk dilüsyonun yarısı kadar olacaktır. Çünkü üzerine inokulumun eşit miktarı eklenir.

Tüplerin inokülasyon ve inkübasyonu : İnokulum yoğunluk standardına uygun olarak, 10^5 — 10^6 CFU/ml. içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bu inokulum sıvı besiyerinde 1:200'e kadar dilüe edilmiştir. Hazırlanan inokulumdan her bir test tüpüne 1 ml. eklenir. Tüpler 35°C 'de 16-20 saat inkube edilir.

Sonuçların değerlendirilmesi : Antibiyotığın en düşük konsantrasyonunda, üremenin tam inhibisyonu MIC'nu verir. Belirsiz üreme ve küçük düğmeler genelde önemsizdir. Eğer plate çukurundaki düğme büyük ve belirli bir yoğunlukta ise, bu ilacın bu konsantrasyonunda üremenin tam inhibisyonunun başarı sağlamadığı düşünülür.

Kontroller : Kalite kontrol çalışmalarının amacı uygulanan metodun doğruluk ve kesinliğinden emin olmaktır. Bu amaçla, özel metodlar ve genetik stabilizasyonu saptanmış referens suşlar kullanılmıştır. Bu suşların değişik antibiyotiklerle MIC'ları saptanmıştır. Kontrol olarak kullanılan bu antibiyotikler için MIC'larının % 95'i bu değerler içinde olmalıdır. Bu kalite kontrol çalışmaları, antimikrobal etkinlik ve dayanıklılık, alet fonksiyonları ve teknik beceri gibi dilüsyon duyarlılık metodolojisinde değişkenliğin sürekli olarak incelenmesini veya gözden geçirilmesini sağlar. Tayin edilen MIC'ları kontrol limitlerinde değilse, bu deneysel bulgulardaki farklılık, teknik olarak sistematik hataların var olduğunu düşündürür.

Diğer kontrol çalışmaları;

— Test organizmalarının yaşam kabiliyetini tayin etmek ve üreme karşılaştırılmalarında gerek duyulan, bazı bakteri-ilac kombinasyonları için yoğunluk kontrolü olarak işe yarayan, antimikrobal ilaçsız, temel besiyerinden ibaret bir üreme kontrolü kullanılmalıdır.

— Her bir inokulum numunesi uygun besiyerine ekilmeli ve kontaminasyon tayini için 1 gece inkube edilmelidir.

— Periyodik olarak, dilüsyon metodlarının tam ve inokulum standardizasyonundan emin olmak için, inokulum numunesinden bakteri sayımları yapılmalıdır.

— Sonuçları okuyan personel tecrübeli olmalı, sonuçlar farklı laboratuvar personeli tarafından bağımsız değerlendirilip karşılaştırılmalıdır.

2 — DİFFÜZYON (YAYINMA) METODU

Diffüzyon yöntemi, medikal laboratuvarlarda hâlâ en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Basit ve çabuk olup, diğer testlerle yaklaşık sonuçlar verir. Bununla beraber, tamamlayıcı yöntem olarak kullanılan dilüsyon testleri ile kullanım oranı hemen hemen yarı yarıya'dır. Duyarlı, az çok duyarlı (intermediate), dirençli olarak tayin edilen organizmaların kalitatif testidir. Bu metod esnek sonuçlar verir. Genellikle üreme oranları yaklaşık organizmalara uygulanabilir. Bunlar Enterobakteriler ve Stafilokoklar gibi çabuk üreyen bakteri türleridir. Bu test şimdi Streptococci, Haemophilus influenza, Neisseria gonorrhoeae ve Pneumococci'lerin testine adapte edilmiştir.

Klinik olarak acil vak'alarda, klinik materyal testte inokulum olarak iş görebilir. Diffüzyon testlerinin yetersizlikleri; non-kantitatif değerlendirme vermesi, birçok yavaş üreyen mikroorganizma ve anaeroblara uygulanamayışı, polimiksinler gibi iyi diffuz olmayan antibiyotiklerin testte kullanılamayışı ve organizmaların önceden bilinen duyarlılıklarındaki hatalardır. Bütün bunlara karşın, rutin testleri için etkili bir metottur. Uygulanmadığında veya daha çok kantitatif sonuçlar istendiğinde dilüsyon testleri ile tamamlanmalıdır.

Bu yöntem çok sayıda değişkenden etkilenmektedir;

- Antibiyotik miktarı ve diffuz edilebilirliği,
- Besiyerinin yoğunluğu ve kalınlığı,
- Besiyerinin bileşimi, pH ve iyonik gücü,
- Ekilen bakteri miktarı ve metabolik faaliyetleri,
- İnkubasyon süresi,
- Antibiyotik ve agarın saklanabilme koşulları.

Diffüzyon yöntemleri ile inkubasyondan sonra elde edilen inhibisyon zonlarından bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıkları saptanmaktadır. Aynı bakteri için, her antibiyotiğin inhibisyon zonu farklı olabilir, fakat bu farklı zonlar farklı duyarlılık olarak değerlendirilemezler. Örn.: Polipeptidler ve polimisinler küçük inhibisyon zonları, penisilinler ise geniş inhibisyon zonları vererek, bir bakteri için aynı oranda duyarlı olabilmektedirler.

Sulandırma yöntemleri ile aynı koşullarda aynı sonuçları veren, çok özel bir standartlaşma gerektirmeyen, ABD ve diğer ülkelerde uygulama alanı bulmuş, veteriner pratiğe de girmiş olan diffüzyon yöntemi Kirby-Bauer adıyla bilinen yöntemdir. Kirby-Bauer yönteminde antibiyotik emdirilmiş diskler kullanılmaktadır. Diffüzyon testleri disk ve multi-disk kullanarak yapılmaktadır. Disk diffüzyon testlerinin multi-disk diffüzyon testlerinden daha uygun sonuçlar verdiği yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur.

Antibiyotikler genellikle kuru filtre kâğıt diskleri halinde besiyerlerine uygulanmıştır. Disk test ortamının inokule edilen yüzeyine uygulandığında bir kaç olay birlikte gelişir. Önce kuru disk agar ortamından su absorbe eder ve ilaç çözünür. Antibiyotik agar ortamına geçerek, diffuz olmak için serbest kalır. Her bir diskin çevresini saran agarda, ilaç konsantrasyonu derece derece değişir. Antibiyotik diffüzyonu ilerledikçe mikrobiyal çoğalma da ilerler. İnhibitör konsantrasyonlarda, ilacın bulunduğu alanda üreme olmadığı görülür. Antibiyotiğe daha duyarlı test organizmalarının inhibisyon zonu daha geniş olacaktır. Generasyon süresi uzun olan mikroorganizmaların, antibiyotiklere karşı daha duyarlı oldukları görülür. Çünkü, ilaçlar diffuz olmak için daha uzun zamana sahiptirler. İnhibisyon zonu- nun büyüklüğünde bakterilerin üreme oranlarındaki değişkenlik farklı ilaçların farklı oranlarda diffuz olması ve kullanılan agardan ilaçların diffüzyon oran farklılıkları etkilidir. Bu sebeple bir antibiyotikle elde edilen zon, diğer antibiyotikle gözlenen zonla karşılaştırılmaz. İnhibisyon zonu- nun çapı, dilüsyon metodundaki MIC değerleri ile indirek olarak orantılıdır.

Her bir antibiyotik için dirençli ve duyarlı kategorileri tayin eden MIC noktaları saptanmalıdır. MIC'ların karşılığı olan \log_2 ve zon çapları arasındaki linear ilişki, istatiksel metod uygulanarak ifade edilebilir.

Pratikte rutin olarak test yapılan antibiyotik sayısı sınırlandırılmıştır. Benzer kimyasal yapıya sahip ve benzer aktivite spektrumunda olan antimikrobiyal ilaçlar bir sınıf olarak kabul edilebilir. Her sınıftan bir ilaç örneği, bu sınıftaki diğer ilaçlar için organizmanın duyarlı veya dirençli olduğunu önceden saptamak için kullanılabilir. İlaç seçiminde önemli olan aktivite spektrumudur. Sınıf numuneleri her bir sınıf içinde en az aktif ilaç olmalıdır. Böylece tüm yanlışlıklar, güvenilmez duyarlılıktan çok, hatalı dirençlilik yönünde meydana ge-

lecektir. Ancak, sınıf numunelerine dirençli bir suş, bu sınıf içindeki ilaçlardan bir veya daha fazlasına duyarlı olabilir. Eğer bu klinik olarak gösterilirse, dilüsyon metodları ile tekrar test edilmeleri gerekir.

NCCLS ve FDA tarafından önerilen ve günümüzde en çok kullanılan disk diffüzyon testleri;

A — Kirby-Bauer Disk Diffüzyon Testi,

B — Agar Overlay Metodu (Barry ve arkadaşları)'dur.

Antibiyotik duyarlılık disklerinin hazırlanması : Bu amaçla emme ve emdiği maddeyi, uygulandığı besiyerine diffuz ettirebilme yeteneği fazla olan kâğıtlar kullanılmaktadır. Bu amaçla Watman No. 1 ve Watman No. 2 süzgeç kâğıtları en uygun kâğıtlar olarak belirlenmiştir. Bu kâğıtlar özel makinalar aracılığıyla 5-7 mm çapında kesilirler. Geniş bir prodüksiyon için değişik antibiyotiklere ait disklerin birtakım nötr boyalarla boyanmasıyla, testlerin değerlendirilmesinde kolaylık sağlanmaktadır. Boyanmış diskler sterilize edilip, aerob ve anaerob şartlarda sterilite kontrolüne bırakılırlar. Kullanılan kâğıdın cinsine göre, her bir diskin emebileceği sıvı miktarı hesaplanır. Bu 0.01- - 0.02 ml. civarındadır. Çözeltilerin hazırlanışında kullanılacak antimikrobik maddenin özellikle potensinin bilinmesine gerek duyulmaktadır. Sterilite kontrollerinden geçmiş, boyalı ya da boyasız diskler 100'erlik veya daha fazla gruplar halinde emebileceği miktarda çözelti ile temasa getirilir. Sonra süzülür. Süzülen diskler serin bir ortamda ventilasyon aracılığıyla ve ultraviyole altında kurutulur. Kurutulmuş diskler 50 veya 100'lük gruplar halinde steril şişelere, steril şartlarda dağıtılıp etikenlendikten sonra, potens ve temizlik kontrollerine alınmalıdır.

A — KIRBY-BAUER DİSK DİFFÜZYON METODU

Disk diffüzyon metodu, Müeller-Hinton agar ile standardize edilmiştir. Mikroorganizmaların çoğunun bu besiyerinde üremesi mümkündür. Bazı mikroorganizmalar, % 5 defibrine koyun, at veya diğer hayvan kanlarının ortama ilave edilmesine gereksinim gösterirler. Nafcillin ve Novobiocin kan ilave edilmiş besiyerinde test edilmemelidir.

Metod : Testi yapılan bakterinin orjinal kültüründen öze ile bir kaç kolonisi alınır ve 4 ml. tryptose phosphate veya trypticase soy

broth içeren test tüpüne inokule edilir. Bu tüpler daha sonra 2-5 saat kadar bakterial süspansiyonu hazırlamak için inkube edilir. Bu süspansiyon gerekirse tuzlu su ile dilüe edilerek Mc Farland No. 0.5 veya 0.5 ml. % 1'lik BaCl çözeltisine, 99.5 ml. % 1'lik sülfirik asit (0.36 M) çözeltisi katılarak hazırlanan standart solüsyona ayarlanır. Petri kutularına 5-6 mm. kalınlığında Müeller-Hinton agar dökülür. Besiyerleri inokulasyondan önce kurutulmalıdır. Müeller-Hinton agar hazırlandıktan sonra 4 gün içinde kullanılmalıdır. Bakteri sıvı süspansiyonu pamuklu swab veya baget ile besiyeri yüzeyine eşit olarak üç yönde yayılır. Bu işlem, bir pipet ile 1-2 ml. miktarında inokulum konulup, bütün besiyerini kapladıktan sonra fazlası alınarak da yapılabilir. Besiyerinin yüzeyi steril şartlarda kurutulur. Diskler agar yüzeyine, uygun aralıklarla, zonlar birbiri üzerine gelmeyecek şekilde, bir pens veya basit disk aplikatörü ile yerleştirilir. Üzerine hafifçe bastırılarak, besiyeri ile teması sağlanır. Hemen veya 30 dk. içinde 37°C'de inkube edilir. Bir gece sonra şekillenen inhibisyon zonları kompasla ölçülerek değerlendirilir.

Birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, antibiyotik ve kemoterapötik ajanlara karşı bakterilerin duyarlılıklarını tayin etmede bu testin modifikasyonları kullanılmaktadır.

B — AGAR OVERLAY METODU

Aynı morfolojik özellikte, izole edilmiş 4-5 koloni seçilir ve tüpte 0.5 ml. Brain heart infusion broth besiyerinde gözle görülebilir yoğunlukta süspansiyon hazırlanır. Bu sıvı kültürler 35-37°C'lik su banyosunda 4-8 saat inkube edilirler. İyice karıştırılmış sıvı kültürden bir öze dolusu (0.001 ml.) % 1.5 sulandırılmış ve 45-50°C'ye soğutulmuş agarın 9 ml.'sine aktarılır. Vida kapaklı tüplerdeki agar, inokulasyondan önce 8 saat bu ısıda tutulmalıdır. Ekim yapılan agar, hafifçe ters döndürme ile karıştırılır ve Müeller-Hinton agar (4 mm derinliğinde) içeren petri kutularının yüzeyleri üzerine eşit olarak yayılır. Petri kutuları ekimden önce oda ısısına getirilmelidir. İnokule edilen petri diskler uygulanmadan önce 3-5 dk. bekletilmelidir.

Besiyerleri inokule edildikten sonra 15 dk. içinde antibiyotik duyurulmuş diskler, steril pensler ile el kullanarak veya mekanik aletlerle besiyeri yüzeyine uygulanır. Tüm diskler agar yüzeyi ile tam kontakt sağlamak için pensler ile agar yüzeyine hafifçe bastırılır. Disklerin yerleştirilmesinde inhibisyon zonları kenarlarının üst

üste gelmesini önlemek için diskler, yeterli uzaklıkta birbirinden ayrı olmalı ve petri kutularının kenarlarına 15 mm.'den daha yakın olmamalıdır. Genel olarak 100 mm.lik petri kutusuna 4 veya 5, 150 mm.lik petri kutusuna 12 veya 13 tane yerleştirilebilir. Diskler uygulandıktan sonra petri kutuları ters çevrilir ve 35°C'de inkubatöre yerleştirilir. İnkübasyon öncesi gecikme antibiyotiklerin prediffüzyonunu arttıracaktır. Artan CO₂'li ortamlarda inkübasyondan kaçınılmalıdır. CO₂ bazı antibiyotiklerin aktivitesine etkili olan yüzey pH'ını değiştirebilir.

Testlerin okuma ve değerlendirilmesi : 16-18 saat inkübasyondan sonra petri kutuları değerlendirilir. Tam inhibisyon zonlarının çapları, uygun aletler (cetvel veya çap pergeli vs.) ile yakın olarak ölçülür. Değerlendirmede siyah zemin kullanılması yararlıdır. Kanlı besiyerinde zonlar agar yüzeyinde ölçülmektedir. Açık inhibisyon zonunda üreyen büyük koloniler, dirençli variantlar veya karışık inokulumu temsil edebilir. Bu testin tekrarını gerektirir. Sülfonamidler veya sülfonamid trimethoprim karışımları durumunda mikroorganizmalar inhibisyon oluşturmada önce birkaç generasyon üreyebilirler. Şekillenen zayıf üreme önemsizdir (% 80 inhibisyon). Klinik olarak acil durumlarda, inokülasyondan 5-6 saat sonra ön bilgi elde edilebilir. Ancak inkübasyon tekrarılanmalı ve son raporlar 16-18 saat dolduktan sonra verilmelidir. Zon çapları duyarlı, az çok duyarlı (intermediate) ve dirençli olarak değerlendirilir. Bu kategoriler için zon çaplarının sınırları daha önceden saptanmıştır.

Testlerin kullanımı ve özel tedbirler : Yavaş üreyen organizmalar, obligat anaeroblar ve capnophiller, çabuk üreyen aerobik veya fakültatif organizmaların testi için standardize edilen disk diffüzyon metodu ile test edilmemelidir. Bunların duyarlılık testleri için dilüsyon metodlarına ihtiyaç vardır. Özel problemler, methicillin-dirençli heterorezistans Staph. aureus'larda görülür. Bu suşlar invitro testlerde duyarlılık gösterse bile Penicillin ve Cephalosporinlere karşı klinik olarak artmış bir direnç görülmektedir. Bazı dirençli suşları saptamakta güçlük çekilmektedir. Testler 35°C'de yapılmalıdır. Çünkü, dirençlilik 37°C'de saptanamamaktadır. P.aeruginosa'nın Gentamisine duyarlılık test sonuçları eriyebilir Mg ve Ca miktarlarına bağlıdır. Polymyxin B ve E agar jel içinde kötü diffuz olur. Disk testinde polymyxinlere direnç önemlidir, ancak sistemik terapi için kullanılacaksa, dilüsyon testleri ile saptanan duyarlılık önemlidir. Disk dif-

füzyon testleri güç üreyen mikroorganizmalar için kullanılacaksa modifiye edilmelidir. Uygun kontrol suşları testin yapıldığı her gün uygulanmalıdır. Tüm kontrol suşları güvenilir kaynaklardan elde edilmiş olmalıdır.

Klinik materyalden direk olarak testin yapımı : Acil klinik infeksiyon problemlerinde, duyarlılık test besiyerlerine direk olarak inokulasyon çok değerli ön bilgi sağlar. Direk testler direk gram boyama preparatlarında çok sayıda tek tür bakteri görülüyorsa, serebrospinal sıvı, diğer vücut sıvıları veya prulent numuneler gibi, acil vak'a numuneleri ile yapılabilir. Bununla beraber, klinik materyalden direk rutin testlerinden sakınılmalıdır. Çünkü, birçok materyalden karışık mikroorganizma ürer ve değerlendirme doğru olmaz. Ayrıca inokulum yoğunluğunu standardize etmek çok güçtür. Acil test sonuçları, deneysel veya ön bilgi olarak rapor edilmeli, önerilen metodlardan biri ile test tekrarlanmalı ve doğruluğu kuvvetlenmelidir.

MİKOBAKTERİLERİN DUYARLILIK TESTLERİ

Mikobakterilerin ilaç duyarlılık tayininde iki ilkenin bilinmesi gerekir. Birincisi; mikobakterilerdeki ilaç rezistansının, ilaçlara maruz kalmaya bağlı olmayışıdır. Mikobakteri kültüründeki ilaç rezistans mutantları streptomisin için 10^2 , isoniazid için 10^5 bakteri olarak saptanmıştır. Mutant insidensinin bilinmesi önemlidir. $10^7 - 10^8$ total rezistant mutanta sahip hastalar tespit edilmiştir. Bu hastalar basit antitüberküloz ilaçlar için sağaltılırsa, kültürleri bu ilaca karşı kısa sürede yalnız dirençli organizmalar meydana getirebilir ve sağaltım başarısız olabilir. Bu sebeple tüberkülozisli hastalar daima iki ve tercih olarak üç ilaçla sağaltılmalıdır. Yalnız bir tek ilaç alındığında, ilaca dirençli basillerin hızla çoğaltılması ile sağaltım başarısız görülebilir.

İkincisi; invivo olarak antimikrobiale ilaca karşı klinik yanıt ve invitro duyarlılık test sonuçları arasındaki korelasyondur. Klinik olarak faydalı olmayan ilaçlarla tedavide, ilaçlara karşı şekillenen direnç, invitro olarak tüberkülozlu hastaların % 1'inden daha fazlasında bulunmuştur. Mikobakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri verilen ilaca karşı duyarlı ve dirençli basillerin tayinini mümkün kılmalıdır. Dirençlilik insidensinin tayini için, duyarlılık test platelerinin genellikle iki setini inokule etmek zorunludur. 2. sette, ilk set için kullanılan inokulumun 100 katlı dilüsyonları kullanılır. Bu metod, orantılı duyarlılık test metodu olarak bilinmektedir.

Şu anda tüberkülozisin sağaltımında kullanılan 11 ilaç vardır. Bunlardan beşi ilk olarak düşünülür. Bunlar; streptomycin, isoniazid, para-aminosalicylic acid, rifampin ve ethambutol'dur. Geriye kalan ethionamide, capreomycin, kanamycin, cycloserine, viomycin ve pyrazinamid ikinci planda düşünülen ilaçlardır. İlk ilaçlara direnç oluştuğunda kullanılmaktadır.

Testin yapılışı: Test 4 çeyreğe bölünmüş plastik petri kutuları kullanılarak yapılır. Her bir çeyreğe 5 ml. agar konulur ve ilk çeyrek antimikrobiale ilaçsızdır, üreme kontrolü olarak kullanılır. Test için yoğun yumurtalı temel besiyeri kullanılmışsa da diğer 7H11 veya 7H10 temel besiyerleri de önerilmektedir. İlaçlar ilave edilmeden önce agar 45°C'ye soğutulur. Bu yolla meydana gelebilecek aktivite kaybı azalır.

İlaç duyarlılık testi için basitleştirilmiş bir metod antitüberküloz ilaçları içeren filtre kâğıt disklerinin kullanımudur. İstenilen ilaç konsantrasyonunu içeren besiyeri plate bölümlerine konulur ve bir çeyreğine disk yerleştirilir. Her bir diskin ilaç konsantrasyonu belirlidir. Duyarlılık test besiyerinin bir setine bakteri inokulumunun 10^{-2} dilüsyonundan 3 damla inokule edilir, ikinci setine 10^{-4} dilüsyondan yine 3 damla inokule edilir. Platelere 37°C'de CO₂'li ortamda inkube edilirler. Ethambutol içeren ortamın 3 haftadan daha fazla inkubasyonu, ilaç inaktivasyonu sonucu mikrokolonilerin görünmesi ile sonuçlanabilir. Sonuçların değerlendirilmesinin bir yolu, ilaçlı besiyeri ve kontrolde kolonilerin direk olarak sayılması veya hesaplanmasıdır. İlaçlı besiyerinde üremede inhibisyon gelse bile tüm koloniler sayılmalı ve kontrol çeyreğindeki kolonilerin sayısı ile karşılaştırılmalıdır. Kontrol bölümü test ortamına ekilmiş mikroorganizmaların sayısını verir. Dirençli koloni %'si 100 katlı sulandırılmış farklı kültürlerin iki dilüsyonu (10^{-2} - 10^{-4}) inokule edilmiş platelerin iki setinden kolayca hesaplanabilir.

Mikobakterial duyarlılık platelerine, aside-dirençli basil'ler için pozitif bulunan salya veya tükürükler yoğunlaştırma ile direk olarak da ekilebilirler (Direk Test). İlk kültür kolonilerinden elde edilen sıvı kültürün kullanımı ile yukarıda tanımlanan metod «İndirek Test» olarak tanımlanmıştır. Direk test eğer materyalde çok sayıda mikobakteri varsa iyi sonuçlar verir. Direk duyarlılık testlerinin avantajı, 6-8 haftada sonuç alınabilen indirek teste karşı 3-4 haftada ilacın dirençli veya duyarlı olduğunun erkenden saptanmasıdır. Direk duyarlılık testinin dezavantajı, başarılı bir üreme için genellikle oldukça

fazla sayıda mikobakteriye ihtiyaç göstermesi ve genellikle kontaminant bakteri üremesinin görülmesidir. Ciddi olarak sağaltılmayan hastalardan izole edilen bakteriler, ilaçlara dirençli organizmalar olarak tayin edilmiştir. Eğer sağaltımında isoniazid gibi bir ilaca karşı, primer bir dirençlilik varsa, uygun miktarları sağlayacak üçlü ilaç sağaltımı önerilmiştir. İlaç tedavisinde iken nüks gösteren hastalardan yapılan bakterial izolatlarda duyarlılık testlerinin yapımı zorunludur. Böyle hastalarda muhtemelen direnç oluşumu yüksektir.

ANAEROB BAKTERİLERİN DUYARLILIK TESTLERİ

Tüm anaerobik izolatlar, rutin antibiyotik testlerine gereksinim göstermezler. Çünkü, çoğunun antimikrobial ilaçlara karşı duyarlılıkları önceden saptanmıştır. Bazı durumlarda test sonuçları yanıltıcı olabilir. Çünkü duyarlılık, polimikrobial ve doğal anaerobik infeksiyon numunesinin alınması ve sonuçların rapor edilmesi arasındaki sürede değişebilir. Bununla beraber duyarlılık testleri tekrarlayan infeksiyonlar veya osteomyelitis gibi uzun süren tedaviye ihtiyaç gösteren infeksiyonlar ile beyin apseleri veya endokarditis gibi ciddi infeksiyonlu hastalar için istenmektedir.

Anaerobik bakterilerin duyarlılık testlerinin standardizasyonunda çalışanlar, tekrarlayan sonuçlar verdiği görülen Agar dilüsyon metodunu yayınlamışlardır. Sıvı dilüsyon testlerinin her ikisi de (makromikrodilüsyon) gelişmiş laboratuvarlarda kolay uygulanmaktadır. Broth-disk tekniği birçok laboratuvarında faydalı kabul edilmiştir. Anaerob bakterilerin duyarlılık testlerinde agar diffüzyon testleri önerilmez. Çünkü yavaş üreyen veya değişik üreme oranlarına sahip anaerob bakteriler ile ortaya çıkan değişiklik ve güçlükler olumsuzdur.

1 — AGAR DİLÜSYON TESTİ

Bilinen agar dilüsyon testinin anaeroblar için modifikasyonudur. Yavaş üreyen ve beslenme yönünden müşkülpesent suşlar için, besiyeri veya inkübasyon süresinin modifikasyonları gerekmektedir. Modifiye test önerilen kontrol suşları ile de test edilmelidir.

Testi yapılan her bir bakteri için indikatörsüz thioglycolate sıvı besiyeri içinde 5 veya daha fazla koloninin inokulumları hazırlanır. Bu besiyeri otoklava girmeden önce vit. K (0.1 µg/ml) ve hemin (5 µg/ml) ile ve kullanılmadan hemen önce sodium bicarbonate (1 mg/

ml) ile tamamlanmış olmalıdır. Besiyeri 18-20 saat inkube edilir veya gerekirse üreme süresi uzatılabilir. İnokulum testte kullanılmadan hemen önce barium sulfat standart yoğunluğuna ayarlanır. Bu inokulum brucella broth içinde de hazırlanabilir.

Testin yapıldığı gün Wilkins-Chalgren agar içinde antimikrobiale ilaç dilüsyonları hazırlanır (Agar dilüsyon tekniğine göre). Bu antibiyotikli besiyeri üzerine, steers replikatörü veya 0.001 ml'lik öze ile inokulumun ekimi yapılır. Petri kutularındaki agar yüzeyinin kuruması sağlandıktan sonra, anaerobik jarlarda 42-48 saat inkube edilir. Her suşun MIC'nu üreme görülmeyen veya ancak belirsiz olarak görülebilen, farklı koloni üremesi oluşmayan en düşük ilaç konsantrasyonudur. Hazırlanan test inokulumları, antibiyotik içeren besiyerlerinin inokulasyonundan önce ve sonra antibiyotik içermeyen Wilkins Chalgren agarın 2 petrisine kontrol olarak inokule edilirler. Besiyerlerinin bir kısmı anaerobik jarda inkube edilir, bir kısmı aerobik veya fakültatif olarak inkube edilir ve kontaminasyon araştırılır.

2 — BROTH DİLÜSYON TESTİ

Bilinen sıvı dilüsyon testlerinin anaerob bakterilerin üremesi için gerekli modifikasyonları yapılmış metottur. Besiyeri olarak 5 µg/ml final konsantrasyonunda, vitamin K₁ (0.1 µg/ml) ve hemin içeren veya % 5 final konsantrasyonda koyun kanlı peptik dijest içeren Brucella broth kullanılabilir. Wilkins-Chalgren sıvı besiyeri veya Schaedter brain heart infusion diğer besiyerleri olarak kullanılabilir. İnokulum, agar dilüsyon testinde olduğu gibi hazırlanır. Minimal CO₂'li sıvı besiyerinde 1:200'e dilüe edilir. Antibiyotik içeren tüplere inokulumun eşit hacmi eklenir ve yaklaşık olarak 48 saat anaerobik jarlarda inkübe edilir. Antibiyotik içermeyen sıvı besiyeri, her bir suşun testi için üreme kontrolü olarak kullanılır. Bir tüp de mikroorganizma inokule edilmeden kullanılır. Bu mikroorganizmaların üremesi dışında, inkubasyon esnasında sıvıdaki zayıf yoğunluğu saptamak için kullanılır. Bu inokule edilmeyen tüpler gerçek üreme ve yoğunluk arasında ayırma yardımcı olur.

3 — BROTH DİSK ELÜSYON TESTLERİ

Bu testte antibiyotikler, istenilen spesifik konsantrasyonu sağlamak ve diffüzyon testlerinde kullanmak için, işaretli kâğıt disklerine sıvı besiyeri içinde adsorbe edilirler.

Wilkins ve Thiel'in Broth Disk Testleri :

Lastik kapaklı tüpler kullanılır. CO₂'li atmosferde % 0.05 cystein, % 0.0005 hemin, % 0.002 menadione ve % 0.5 yeast extract ilave edilmiş, brain heart infusionun 5 ml.'sine bir veya daha fazla antibiyotik diskleri konulur. Elde edilen konsantrasyon besiyerinin hacmi arttırılarak veya disk sayısının artması ile ayarlanabilir. İnokulum, Chopped-meat besiyerinde 18-24 saatlik kültürler ile hazırlanır. CO₂'li atmosferde, antibiyotik içeren her bir tüpe inokulumdan bir damla damlatılır. Tüpler 35°C'de 18-24 saat inkube edilirler. Üreme kontrol ile ilaç içeren tüplerdeki sıvının yoğunluğu karşılaştırılır. İlaça karşı duyarlılık, üreme kontrolünün % 50'sinden daha az yoğunlukta olması veya yoğunluğun olmaması olarak tayin edilir.

Kuraynski ve Arkadaşlarının Broth Elüsyon Testleri :

Yukarıda tanımlanan testin basit bir modifikasyonudur. CO₂'li ortamda uygulamaya gereksinim göstermez. Thioglycolate besiyerinde yapılan bu testler aerobik olarak inkube edilirler. İnkübasyon 35°C'de yapılır. Sonuçlar Wilkins ve Thiel metodundaki gibi değerlendirilir.

4 — ANAEROBLAR İÇİN DİĞER BİR TÜP TEKNİĞİ

Besiyeri olarak VF jeloz besiyeri (1000 ml.) + Demir sülfat (0.5 gr.) + Glukoz (2 gr.) kullanılır (pH 7.4). Besiyerinde sporlu bakteriler için 10⁻⁷ - 10⁻⁸, çabuk üreyen sporsuz bakteriler için 10⁻⁵, zayıf kültürler için 10⁻³ - 10⁻⁴ sulandırmalar hazırlanır. 80 ml. besiyeriyile 2 ml. optimal dilüsyon hazırlanır. 5 tüpe 10'ar ml. dağıtılarak, soğuk su altında hızla soğutulur. Araya disk konularak 10'ar damla erimiş ve 80°C'de ayarlanmış jeloz ilave edilir. Üzerine aynı miktarda ekilmiş besiyeri konur. Yavaş üreyen bakteriler için 37°C'de, çabuk üreyenler 37°C'de inkübe edilip 12 saat sonunda oda ısısında bırakılırlar. İnhibisyon zonu disklere göre değerlendirilir. Sonuçlar sıvı besiyerinde indikatörün rengine göre değerlendirilir.

5 — CHABBERT TEKNİĞİ

Test için Viant Fua jelozundan, jelatin jelozundan veya antibiyogram için özel besiyerlerinden yararlanılır. Besiyerleri 20 dk. 100°C'de bekletilir ve 45°C'ye soğutulduktan sonra incelenecek bakteriden bir damla damlatılır. Petri kutusuna döküldükten sonra diskler yer-

leştirilir. Tekrar besiyeri dökülerek soğutulur. İnhibisyon zonunun varlığı veya yokluğu ancak kalitatif olarak değerlendirilebilir.

ANTİFUNGAL İLAÇLAR İLE DUYARLILIK TESTLERİ

Antifungal ilaçlar ile duyarlılık testleri, antibakteriyel ilaçlar ile yapılan testlerde aynı sonuçları almak amacı ile yapılır. Burada amaç, insan infeksiyonlarının sağaltımında kullanmak için en uygun ilaçların seçimine izin verecek güvenilir bilgiyi sağlamaktır. Bu bilgi, olabilecek klinik yanıtın önceden haber verilmesi gibi kalitatif veya MIC'lerin tayini gibi kantitatif olabilir. Antifungal ilaçlar ile yapılan testler, antibakteriyel ilaçlarla yapılan duyarlılık testlerinin benzeridir. Ancak bunun yapımı, antifungal ilaçlar için daha güçtür ve farklılıklar vardır. En önemlileri, organizmaların çoğundaki üreme farklılıkları ve testte kullanılan besiyeri bileşiminin temel özelliklerindeki farklılıklardır.

Antifungal ilaçlar ile invitro testler, mantarların bazı karakterleriyle güçleşir. Bu karakterler dimorfizm, uzun üreme süresi ve spesifik üreme ısısıdır. Mantarların üreme ısı farklarından dolayı ortalama inkubasyon ısısı olarak 30°C alınmıştır.

Antifungal ilaçlara örnek olarak antifungal antibiyotiklerden amphotericin B ve nystatin, sentetik imidazollerden miconazole ve sentetik antimetabolit 5-fluorocytosine verebiliriz.

Antifungal ilaçlar ile invitro duyarlılık test yapımı için 3 metot tanımlanmıştır.

1 — Broth dilusyon

2 — Agar dilusyon

3 — Diffüzyon disk testi

1 — BROTH DİLUSYON METODU

Sıvı dilusyon metodu, spesifik mikroorganizmalar için verilen antifungal ilaçların MIC'lerinin kantitatif değerini invitro olarak ölçmeyi sağlar. Aynı zamanda, bileşimin minimal fungisidal konsantrasyon değerini ölçmeyi de sağlayabilir.

Besiyeri : Besiyerinin seçimi, testi yapılan ilaca bağlıdır. Unbuffered (tamponsuz) yeast-nitrogen base'e % 1 glikoz ve % 0.15 as-

paragine eklenerek 5-FC ile yapılan testte kullanılmaktadır. Amphotericin B ve nystatin ile testler antibiyotik besiyeri 3FDA'da yapılmaktadır. Miconazole ve ketoconazole brain heart infusion broth ve sabouraud gibi zengin besiyerleri ile antagonize edilirler. Bu substanslar için uygun besiyerleri YNB ve casein-yeast extract glukoz brohtur. 3 grup ilaç için tek uygun besiyeri YNB bufferdir.

İlaç solusyonları : Standart 5-FC solusyonu distile suda hazırlanmış ve titrasyon ile sterilize edilmiştir. Amphotericin B ve nystatin ile standart ilaçtan 5.000 µg/ml. solusyon hazırlanır. Bu ilaçların standart substansları dimethyl sulfoxide veya dimethylformamide'de eritilebilir. İmidazoller için değişik eriticiler kullanılmıştır. Ketoconazole en iyi 0.2 N HCl'de çözünür.

İnokulum hazırlanması : İnokulum Sabouraud agar veya YNB agarda üreyen 28-48 saatlik kültürlerden hazırlanır. Süspansiyonlar steril tuzlu su ile hazırlanır. 530 nm'de % 95 transmissiona ayarlanır. İnokulum ayarlama da diğer bir teknik Wickerham card tekniğidir. Aynı süspansiyon kontrol organizmaları için de hazırlanmalıdır.

İlaç dilusyonları - testin yapılışı : 1 x YNB, antibiyotik besiyeri 3FDA, casein-yeast extract-glucose broth veya 1 x YNB buffer ile ilaçların 128 mg/ml. solusyonları veya Amphotericin B'nin 32 mg/ml. solusyonundan 10 ml. miktarında hazırlanır.

12 steril tüp alınır. 2. den 12. tüpe kadar 5 ml. uygun sıvı besiyeri konulur. 1 ve 2. tüplere ilaç solusyonlarının 5 ml.'si ilave edilir. 2 tüp içindekiler karıştırılır ve seri olarak ilaçlar dilue edilirler. Son tüpten 5 ml. atılır. Bu işlem 0.06 - 128 mg/ml. Amphotericin B için 0.02 - 32 mg/ml. konsantrasyonda dilusyon serilerini verecektir. Her dilusyondan 4 ml. alınır ve 4 steril tüpe eşit olarak bölünür. Geriye kalan 1 ml. kontrol olarak kullanılır. Üreme kontrolü olarak 4 ml. inokulum bulunan tüpe, 1 ml. ilaçsız sıvı besiyeri eklenir. Kontrol organizmaları ve testin standardize süspansiyonunun 0.05 ml.'si ile ilacın her bir konsantrasyonunun her iki tüpü inokule edilir. Aynı zamanda üreme kontrolü için ilaçsız besiyerinin iki tüpü her bir süspansiyon ile inokule edilir. Kültürler 30°C'de 48 saat veya üreme kontrol tüpünde görülür bir üreme oluncaya kadar inkübe edilirler. Üreme kontrol pozitif verdikten sonra en kısa sürede okunmalıdır. İnkübasyondan sonra tüpler incelenir ve MIC'lar kayıt edilir. MIC, zayıf bir yoğunluk veya belirsiz bir üreme ile açık olarak görülebilen, üreme inhibisyo-

nuna neden olan ilaçların en düşük konsantrasyonu olarak tayin edilir. Minimal fungisidal konsantrasyon 3 koloniden daha az veya negatif subkültürlerde kullanılan ilaçların en düşük konsantrasyonu olarak hesaplanır.

2 — AGAR DİLUSYON METODU

Antibakteriyel ilaçlarda olduğu gibi, antifungal ilaçlarla sıvı dilüsyon testleri, agar dilüsyon testlerine adapte edilebilir. Agar dilüsyon testleri *C.albicans*'ın imidazole karşı direncini saptayamaz. Buna karşın agar dilüsyon testi sıvı dilüsyon testine oranla daha etkili bulunmuştur.

İlaç dilüsyonları ve besiyerleri : Stok ilaç solüsyonları yukarıda tanımlandığı gibi hazırlanır. İlaç dilüsyonları arzu edilen final konsantrasyonun 10 katı titrede uygun bir sıvı besiyerinde hazırlanır. Dilüsyonlar Molten agara 1/10 oranında olacak şekilde ilave edilir. Uygun besiyerleri antibiyotik medium 12, poliyene için bufferli yeast morphology agar (YMA), 5-FC için buffersiz YMA ve imidazol için casein-yeast extract glucose agar'dır. 5-FC dışında tüm ilaçlar için uygun bir besiyeri Kimmig agar'dır. Bufferli YMA, antifungal ilaçların tümü için önerilmektedir.

İnokulum ve testin yapılışı : Agar dilüsyon testleri için inokulum, sıvı dilüsyon testleri için yukarıda tanımlandığı gibi hazırlanmaktadır. İnokulasyonda en az 10^6 CFU/ml, organizma taşıyan 0.001 - 0.003 ml.'ye ayarlanmış mekanik replikatörler kullanılmaktadır. Bu testte ilaç dilüsyonlarını içeren besiyerlerinin inokulasyonundan önce ve sonra ilaçsız besiyerlerinin ekimi yapılır. Testten güvenilir sonuçlar elde etmek için her bir kontrolden pozitif üreme yanıtları alınmalıdır. İnkübasyon 30°C'de yapılır. İnkübasyon süresi, ilaçsız kontrol besiyerlerinde, üremenin görülmesiyle ayarlanabilir. Sonuçlar kolonilerin olgunlaştığı görüldüğünde okunmalıdır. MIC makroskobik olarak görülebilen kolonilerin üremesini engelleyen ilaçların en düşük konsantrasyonu olarak tayin edilir. Belirsiz veya nokta şeklindeki koloniler negatif olarak kabul edilir.

İnokulum hacmi 5-FC ile testte çok önemlidir. Aşırı derecede küçük inokulum invitro duyarlılıkta güvenilir sonuçlar verir. İmidazolde besiyerinin seçimi çok önemlidir. Çok zengin besiyeri, invitro rezistansın yanlış saptanmasına neden olur. Antifungal ajanlar

ile sıvı ve agar dilusyon test metodlarının standardizasyonu için bu iki problemin çözülmesi gerekir.

3 — DİFFUZYON DİSK TESTLERİ

Antifungal ilaçlarla diffüzyon disk testleri tanımlanmış ancak henüz tam olarak standardize edilememiştir. Deneysel olarak hazırlanmış disk çeşitleri ticari olarak bulunmaktadır. Antifungal ilaçlar ile diffüzyon disk testlerinin uygulanması sınırlıdır. Poliyene bileşik-leri ve imidazol için bu testin uygulanması sakıncalıdır (Eksik duyarlılık, farklı erime özelliği, vs.). 5-FC diffüzyon disk testlerine kolayca uygulanabilir bir substansdır.

Test, selektif besiyerinde, diffüzyon disk metoduna göre ve her antifungal ajan için modifiye edilerek uygulanır. Zon çaplarına göre sonuçlar, duyarlı, az çok duyarlı (intermediate) ve dirençli olarak değerlendirilir.

Antifungal ajanlarla diffüzyon testlerinde disklerden başka tabletler de kullanılmaktadır. Yapılan diffüzyon tablet testleri, disk testlerinin bir analogüdür.

KAYNAKLAR

- 1 — ARDA, M. (1981) : Genel Bakteriyoloji. Ders Kitabı. 267. A.Ü. Vet. Fak. Yayn. 369.
- 2 — İYDİN, N. (1977) : Antibiyotik duyarlılık testleri. Seminer. Etlik Hayvan Hast. Araştırma Enstitüsü.
- 3 — BARRY, A.L., THORNSBERRY, C. (1985) : Susceptibility Test: Diffusion Test Procedures. Manual of Clinical Microbiology. 4th. ed. (Ed. E.H. Lennette), 978-987., American Society for Microbiology. Washington. D.C.
- 4 — BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C. and TURCK, M. (1966) : Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Registry of Medical Technology., 36(3): 493-496.
- 5 — BOURDEN, J.L. and MARCHAL, N. (1973) : Techniques Bacteriologiques. Don Editeurs 8 Place de l'Odéon, Paris 60.
- 6 — CAMBAZOĞLU, M. (1982-1983) : Çeşitli mikroorganizmalarda konsantrasyon ve değişik besiyerlerinin antibiyotik duyarlılık testi üzerine etkilerinin araştırılması. Etlik Vet. Mikrobiyol. Enst. Derg., 5(4-5): 79-109.

- 7 — GARRY, V. DOERN., SCOTT, D.R., ABDEL, L. and KIM, K.S. (1981) : Evaluation of a direct blood culture disk diffusion antimicrobial susceptibility test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 20(5): 695-98.
- 8 — JONES, R.N., BARRY, A.L., GAVON, T.L. and WASHINGTON, J.A. (1985) : Susceptibility tests: Microdilution and macrodilution broth procedures. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th. ed. (Ed. E.H. Lennette), 972-977., American Society for Microbiology. Washington. D.C.
- 9 — KONEMAN, E.W. (1979) : *Diagnostic Microbiology*. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. Toronto.
- 10 — LINDBERG, A.A., NORD, C.E. and DAHLBACK, A. (1977) : Rapid identification and antibiotic sensitivity testing of bacteria isolated from clinical infections. *Med. Microbiol., Immunol.*, 163: 13-14.
- 11 — OLDS, R.J. (1975) : *A Colour Atlas of Microbiology*. Published by Wolfe Medical Publications Ltd. Printed by Smeets-Weert, Holland.
- 12 — RICHARD, F.D. and HOCHSTEIN, L. (1982) : Evaluation of a rapid inoculum preparation method for agar disk diffusion susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.*, 15(2): 282-285.
- 13 — ROSENBLATT, J.E. (1977) : Laboratory tests used to guide antimicrobial therapy. *Mayo Clin. Proc.*, 52: 611-615.
- 14 — SCHOENKNECHT, F.D., SABATH, L.D. and THOMSBERRY, C. (1985) : Susceptibility Tests: Special Tests. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th. ed. (Ed. E.H. Lennette), 1000-71., American Society for Microbiology. Washington. D.C.
- 15 — SHADOMY, S., INGROFF, A.E. and CARTWRIGHT, R.Y. (1985) : Laboratory studies with antifungal agents: Susceptibility tests and bioassay. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th. ed. (Ed. E.H. Lennette), 991-999. American Society for Microbiology. Washington. D.C.
- 16 — SUTTER, V.L. (1985) : Susceptibility testing of anaerobes. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th. ed. (Ed. E.H. Lennette), 988-990., American Society for Microbiology. Washington. D.C.
- 17 — THOMSBERRY, C. and SCERRIS, J.C. (1985) : General Considerations. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th. ed. (Ed. E.H. Lennette), 959-965., American Society for Microbiology. Washington. D.C.
- 18 — WASHINGTON, I.J.A. (1985) : Susceptibility Tests: Agar Dilution. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th. ed. (Ed. E.H. Lennette), 967-971., American Society for Microbiology. Washington. D.C.