

Antibiyotik Kombinasyonlarının In vitro Etkinliğinin Saptanması

Çiğdem BAL*

* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

Antibiyotik kombinasyonlarının in vivo olarak en sık kullanım nedenleri; özellikle ciddi infeksiyon ve septisemi olgularındaki başlangıç ampirik tedavi, polimikrobiyal infeksiyon tedavisi, dirençli mikroorganizmalara karşı sinerjist etki elde etme, dirençli mikroorganizmaların seleksiyonunu önleyerek insidansını düşürme ve aminoglikozidlerde olduğu gibi doza bağlı toksisiteyi azaltma olarak sıralanabilir.

Antibiyotik kombinasyonlarının in vivo etkisini saptamak üzere uygulanan in vitro testler sinerji testleri adını alır. Bu testlerin sonuçlarına göre kombinasyonun etkisi, antibiyotikler tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamından daha yüksekse sinerjizmden, düşükse antagonizmden, toplamına eşitse indiferan (aditif) etkiden söz edilir. Sinerjinin bir diğer tanımı olarak tek başına bir antibiyotiğin MİK değerine oranla, aynı antibiyotiğin kombinasyon MİK'inde en az dört kat düşüş de kullanılmaktadır^[1,2].

Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğini ölçen testler:

- Dilüsyon checkerboard yöntemleri,
 - Mikrodilüsyon
 - Makrodilüsyon
 - Agar dilüsyon
- Zamana bağlı öldürme yöntemi (time-kill method),
- Disk diffüzyon yöntemi,

- E test yöntemi olarak özetlenebilir^[3].

Bu testlerden dilüsyon yöntemleri kombinasyonun inhibisyon etkisini, zamana bağlı ölüm incelemeleri ise bakterisidal etkisini ölçmede yararlanılan testlerdir^[1]. Sinerjist etkisi olduğu bildirilen antibiyotik kombinasyonları Tablo 1'de, sinerji testlerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 2'de verilmiştir.

CHECKERBOARD YÖNTEMİ

Checkerboard (dama tahtası) yöntemi antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkisini ölçmede en sık kullanılan yöntem olmuştur çünkü bu yöntemin kolay anlaşılabilir bir mantığı vardır ve sonuçları yorumlamak için kullanılan matematiksel hesaplamalar zor değildir. Bu nedenle özellikle mikrodilüsyon yöntemine alışkın klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rahatlıkla uygulanabilir. Checkerboard yöntemi için makrodilüsyon tekniği standart kabul edilmişse de^[1], mikrodilüsyonun MİK tayinindeki bilinen avantajları aynen burada da geçerli olduğundan checkerboard mikrodilüsyon yöntemi en yaygın kullanılan teknik olmuştur.

Mikrodilüsyon Yöntemi^[1,4]

- Yöntemde 96 kuyucuklu ve U-tabanlı steril polistiren mikroplyetler kullanılır.
- Her bakteri suşu ve buna karşı denenecek kombinasyon için bir mikroplyet paneli gereklidir.
- Sinerji testi için tek antibiyotik stok solüsyonları hazırlanır ve buradan ayrı tüplerde çift kat seri di-

Tablo 1. İn vitro sinerjistik etkisi olduğu gösterilmiş antibiyotik kombinasyonları^[1,4]

Kombinasyon	Etkili olduğu bakteriler
Beta-laktam + Aminoglikozid (Ampisilin, sefalotin, karbenisilin, azlosilin, aztreonam, seftazidim, seftriakson, sefotaksim, piperasilin) + (Gentamisin, amikasin)	Gram negatifler <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> ve diğer Enterobacteriaceae
(İmipenem, karbenisilin, tikarsilin, azlosilin, piperasilin, seftazidim, seftriakson, sefepim, aztreonam) + (Gentamisin, amikasin, netilmisin, tobramisin)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> ve diğer nonfermentatifler
Beta-laktam + Aminoglikozid (İmipenem, sefalotin, penisilin) + (Gentamisin, tobramisin, kanamisin, netilmisin)	Gram pozitifler <i>Staphylococcus aureus</i>
(Penisilin, imipenem, ampisilin, karbenisilin) + (Gentamisin, amikasin, tobramisin, netilmisin)	Enterokok
(Penisilin, ampisilin) + (Gentamisin, streptomisin)	<i>Listeria monocytogenes</i>
Beta-laktam + Beta-laktamaz inhibitörü (Ampisilin, amoksisilin, piperasilin, sefoperazon, seftriakson, aztreonam, karbenisilin, tikarsilin) + (Sulbaktam, klavulanik asit, tazobaktam)	Enterobacteriaceae, nonfermentatifler, <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>S. aureus</i>
Beta-laktam + Beta-laktam Meropenem + Çeşitli beta-laktamlar	Metisiline dirençli <i>S. aureus</i> (MRSA)
Glikopeptid + Beta-laktam (Vankomisin, teikoplanin) + (Ampisilin, imipenem) Vankomisin + (Sefoperazon, imipenem) Teikoplanin + İmipenem Vankomisin + Karbenisilin	Koagülaz negatif stafilokok (KNS) MRSA Enterokok <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Glikopeptid + Aminoglikozid (Vankomisin, teikoplanin) + (Gentamisin, tobramisin) Vankomisin + Tobramisin Teikoplanin + Rifampin	Korineformlar KNS MRSA
Glikopeptid + Kinolon Vankomisin + Siprofloksasin	Enterokok
Kinolon + Beta-laktam Siprofloksasin + (İmipenem, sefoperazon, aztreonam, ampisilin)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Kinolon + Aminoglikozid Siprofloksasin + (Amikasin, gentamisin)	<i>P. aeruginosa</i>
Diğer Rifampin + TMP-SMX + Karbenisilin Siprofloksasin + Sefoksitin	<i>S. maltophilia</i> <i>Bacteroides fragilis</i> grubu

Tablo 2. Antibiyotik kombinasyonlarının sinerjistik etkisini değerlendirmede kullanılan testler^[1]

Yöntem	Ölçülebilen antibakteriyel etki	Avantaj	Dezavantaj
• Checkerboard Makrodilüsyon Mikrodilüsyon Agar dilüsyon	Bakteriyostatik Bakteriyostatik Bakteriyostatik	Üreme olmayan tüp veya kuyucuklardan yayma yapılarak sidal etki ölçülebilir. Çok sayıda kombinasyon ve konsantrasyon denenebilir.	Bakterisidal etki datasını elde etmek zordur, öldürme hızını vermez.
• Ölüm eğrisi	Bakterisidal	Belirli ilaç konsantrasyonlarındaki bakteri ölümünün iyi bir göstergesidir.	Az sayıda kombinasyon denenebilir.
• Disk diffüzyon	Bakteriyostatik		Bakterisidal etki datasını elde etmek zordur. Antibiyotiğin diffüzyonuyla ortamda oluşan ilaç konsantrasyon gradientleri klinikte elde edilebilen ilaç düzeyleriyle uyum göstermez.

lasyonlar yapılır. Kombinasyon denenecek her kuyucuk sıra veya sütununda istenen son konsantrasyon için, tüpte bu konsantrasyonun iki katı bulunmalıdır. Çünkü her iki antibiyotik eşit miktarlarda aynı kuyucukta bulunacak ve birbirini bir kat dilüe edecektir.

- Her iki antibiyotik solüsyonundan kombinasyon denenecek bir kuyucuğa aktarılabilecek miktar 50'şer µL'dir. Böylece bir test kuyucuğundaki son hacim 100 µL olacaktır.

- Her mikroye panelinde ilk yatay sıra (A2-A12) ve ilk dikey sütun (B1-H1) kuyucukları tek antibiyotiklerin (a ve b antibiyotikleri) MİK'lerinin belirlenmesi için kullanılır. Diğer kuyucuklar a + b kombinasyonlarını içerecektir.

- Tüplerde kuyucuklara aktarılabilecek antibiyotik dilüsyonları (bir üst konsantrasyonda) hazırlanırken solüsyon miktarı, kuyucuk sayısı x her kuyucuk için 50 µL olarak hesaplanmalıdır. Örneğin a antibiyotiğinin kuyucuktaki konsantrasyonu 0.5 µg/mL olursa tüpte hazırlanan konsantrasyonu 1 µg/mL olmalı ve 0.5 µg/mL a antibiyotiği içerecek kuyucuk sayısı x

50 µL olarak hesaplanmalıdır (0.5 µg/mL a antibiyotiği içerecek 8 kuyucuk x 50 µL = Tüpte 400 µL).

- Kombinasyona giren her antibiyotiğin, o mikroorganizma için bilinen veya beklenen MİK değerinin en az üç-dört dilüsyon aşığından MİK'in en az iki, tercihen sekiz katına kadarki dilüsyonları kullanılmalıdır.

- Deneyde suşların kanlı agar gibi nonselektif bir besiyerindeki bir gecelik kültürü kullanılmalıdır.

- Bakteri inokulumu için katyon (Mg²⁺: 10-12.5 mg/L, Ca²⁺: 20-25 mg/L) destekli Mueller-Hinton buyyon (MHB) veya steril %0.8.5 tuzlu su kullanılabilir. Direkt koloni süspansiyon yöntemi ile inokulum hazırlanabilir. Bulanıklık 0.5 McFarland standardına göre ayarlanır.

- İnokulum için 0.5 McFarland bulanıklığında (1.5 x 10⁸ CFU/mL) bakteri süspansiyonu hazırlanır ve 1:30 oranında dilüe edilip (5 x 10⁶ CFU/mL) buradan sterilite kontrol kuyucuğu dışındaki her kuyucuğa 10 µL (5 x 10⁴ CFU) inoküle edilir. Böylece, bir kuyucuktaki 100 µL antibiyotik kombinasyonu

solüsyonu içindeki bakteri sayısı 5×10^4 CFU/100 μ L veya 5×10^5 CFU/mL olur.

- Bakteri süspansiyonunda MHB kullanılmışsa, antibiyotik dilüsyonlarının yine MHB ile yapılması tercih edilmelidir.

- Her deneyde bir kuyucuk (A1) antibiyotiksiz bırakılır ve üreme kontrolü olarak değerlendirilir. Test okunurken bu kuyucukta yoğun bulanıklık görülmelidir.

- Bir kuyucuk (H12) yalnız besiyeri içerir ve besiyeri sterilite kontrolü olarak kullanılır.

- Testin kalite kontrolü için, uygun ATCC suşlarıyla, aynı antibiyotik stok solüsyonları ve sulandırıcılarla, fakat ayrı bir mikropleyette MİK deneyi yürütülür.

- İnokulum saflık kontrolü için, kullanılan bakteri süspansiyonu (5×10^6 CFU/mL) 1:100 oranında sulandırılıp 1 μ L bir kanlı agar plağına yayılır ve ertesi gün saflık araştırılır.

- İnokulum yoğunluğunun kontrolü için üreme kontrol kuyucuğundan alınan bir miktar bakteri süspansiyonu 1:500 oranında %0.8.5 steril tuzlu suyla dilüe edilir ve buradan alınan 100 μ L bir kanlı agar plağına yayılır.

Örnek: Üreme kuyucuğundan 10 μ L tüpe alınır ve 90 μ L steril tuzlu su eklenir (1:10 dilüsyon). Bu tüpten 1:10 dilüsyon yapılır (toplam 1:100 dilüsyon). Son tüpten 1:5 dilüsyon yapılarak (toplam 1:500 dilüsyon) bu son dilüsyondan 100 μ L kanlı agarı yayılır. 16-20 saat 35-37°C'de inkübasyon sonunda plakta 75-125 (ortalama 100) koloni bulun-

malıdır. Koloni sayısı dilüsyon faktörü olan 500 ile çarpılırsa 100 μ L'deki CFU sayısı (veya 5000 ile çarpılırsa mL'deki CFU sayısı) bulunur. Yüz koloni sayıldıysa $100 \times 5000 = 5 \times 10^5$ CFU/mL doğru inokulumu gösterecektir. < 75 veya > 125 sayıları bulunmuşsa inokulum hatası nedeniyle sinerji testi geçersizdir.

- Checkerboard yönteminin uygulanışına örnek olarak Şekil 1'de birinci aşama için MİK değeri 64 μ g/mL olan bir a antibiyotiğinin, Şekil 2'de ikinci aşama olarak MİK değeri 8 μ g/mL olan bir b antibiyotiğinin tüplerden panele aktarılmış şekilleri ve son dilüsyonları verilmiş, Şekil 3'te ise bu iki aşamanın sonunda a + b antibiyotik kombinasyonu için elde edilmiş olan checkerboard paneli gösterilmiştir.

- Checkerboard paneli tamamlandıktan sonra mikropleyitin kapağı kapatılır. 16-20 saat 35-37°C'de inkübe edilir. Hızlı üreyen patojenler için 6-8 saatte sonuç alınabilmekle birlikte standart süreleri kullanmakta yarar vardır.

- Kalite kontrol suşlarının MİK değerleri uygunsa ve üreme kontrolü, besiyeri sterilite kontrolü, inokulum saflık kontrolü, inokulum yoğunluk sonuçları geçerliyse mikropleyitin okunmasına geçilir. Önce A2-A12 sırasındaki a antibiyotiğinin, sonra da B1-H1 sütunundaki b antibiyotiğinin tek başına MİK değerleri okunur ve kaydedilir (Şekil 4).

Kombinasyon testinin okunmasına geçilip her sıra ve sütunda üreme olan kuyucuklar pozitif kabul edilerek kayıt formunda işaretlenir, hiç üreme görülmeyenler boş bırakılır. Böylece örnek olarak Şekil 4'te verilen gibi bir sonuç elde edilir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Üreme kontrolü	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512	
B	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512	
C	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512	
D	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512	
E	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512	
F	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512	
G	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512	
H	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256		Sterilite kontrolü

Şekil 1. MİK değeri 64 μ g/mL olan a antibiyotiğinin mikropleyetteki dilüsyonları (μ g/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Üreme kontrolü											
B	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1
C	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2
D	b4	b4	b4	b4	b4	b4	b4	b4	b4	b4	b4	b4
E	b8	b8	b8	b8	b8	b8	b8	b8	b8	b8	b8	b8
F	b16	b16	b16	b16	b16	b16	b16	b16	b16	b16	b16	b16
G	b32	b32	b32	b32	b32	b32	b32	b32	b32	b32	b32	b32
H	b64	b64	b64	b64	b64	b64	b64	b64	b64	b64	b64	Sterilite kontrolü

Şekil 2. MİK değeri 8 µg/mL olan b antibiyotiklerinin mikroplyttteki dilüsyonları (µg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Üreme kontrolü											
B	b1	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1	b1
C	b2	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2	b2
D	b4	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		b4	b4	b4	b4	b4	b4	b4	b4	b4	b4	b4
E	b8	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		b8	b8	b8	b8	b8	b8	b8	b8	b8	b8	b8
F	b16	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		b16	b16	b16	b16	b16	b16	b16	b16	b16	b16	b16
G	b32	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	a512
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		b32	b32	b32	b32	b32	b32	b32	b32	b32	b32	b32
H	b64	a0.5	a1	a2	a4	a8	a16	a32	a64	a128	a256	
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Sterilite kontrolü
		b64	b64	b64	b64	b64	b64	b64	b64	b64	b64	

Şekil 3. Kombinasyon etkisi denenecek a ve b antibiyotiklerinin paneldeki son kombinasyon-dilüsyonları (µg/mL)^[4]

• Elde edilen sonuçlar MİK'in katları olarak sematize edilip (Şekil 5), izoblogram adı verilen ve logaritmik verileri aritmetik skalaya dönüştüren diyagramlarla da (Şekil 6) gösterilebilir. İzoblogramda b antibiyotiklerinin (x eksen) her dilüsyonu için a antibiyotiklerinin (y eksen) dilüsyonlarına göre üreme pozitiflikleri Şekil 6'daki gibi işaretlenir. x ve y eksenle-

rinde dilüsyon değerleri yerine, bu dilüsyonların MİK'in katları olarak eşdeğerlerinin yazılması kolaylık getirir.

• Sonuçların yorumu için önce her iki antibiyotik için ayrı ayrı fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FIK) değerleri hesaplanır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Üreme kontrolü											
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												Sterilite kontrolü

Şekil 4. Mikrodilüsyon checkerboard kayıt formu örneği^{4]}

a antibiyotiği: Mikroorganizma:

b antibiyotiği: İnokulum koloni sayısı: CFU/mL

$$FİK_a = \frac{\text{a antibiyotiğinin kombinasyondaki MİK değeri}}{\text{a antibiyotiğinin tek başına MİK değeri}}$$

$$FİK_b = \frac{\text{b antibiyotiğinin kombinasyondaki MİK değeri}}{\text{b antibiyotiğinin tek başına MİK değeri}}$$

$$FİK \text{ indeksi } (\Sigma FİK) = FİK_a + FİK_b$$

$\Sigma FİK \leq 0.5$ ise sinerjistik,

$> 0.5 - \leq 4$ ise aditif veya indiferan,

> 4 ise antagonist etki

şeklinde yorum yapılabilir.

Makrodilüsyon Yöntemi

Mikrodilüsyon yöntemindeki tüm çalışma basamakları burada da geçerlidir. Fark, mikrodilüsyondaki kuyucukların yerine burada deney tüpleriyle çalışılmasıdır. Bu nedenle her tüpte bulunması gereken miktar 0.25'er mL her iki antibiyotik solüsyonu ve 0.5 mL bakteri süspansiyonu olmak üzere toplam 1 mL'dir. Öte yandan "makro" hacimlerle çalışıldığından mikrodilüsyon için kullanılan panelin tümünü makrodilüsyon yöntemiyle yürütmek zordur. Genel-

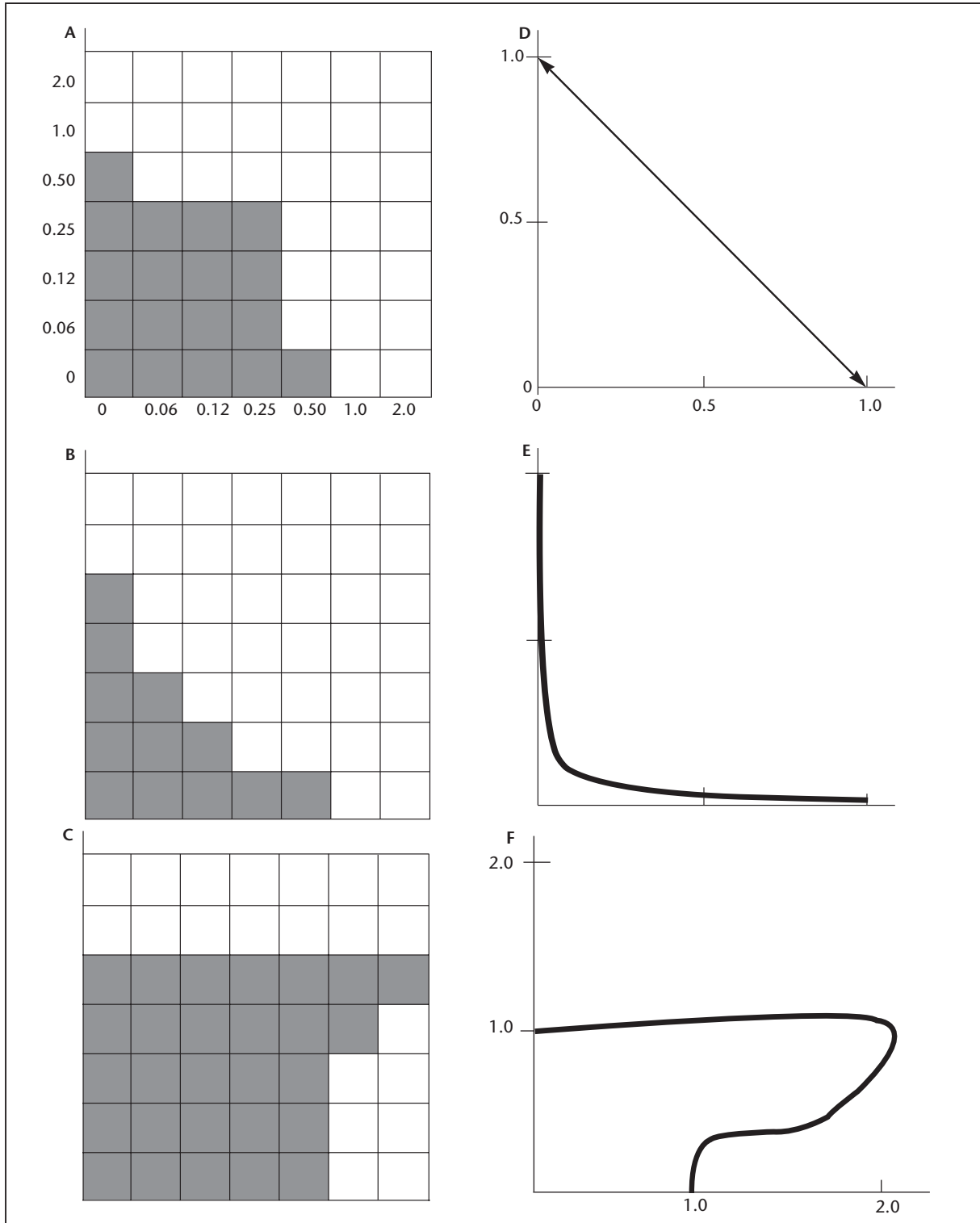
likle kısıtlı panel hazırlanır ve $1/2$ MİK, MİK ve $2 \times$ MİK değerleriyle çalışılır. Antibiyotik stok solüsyonları her test tüpünde istenen son konsantrasyonun 4 katı olmalıdır. Değerlendirmeler aynı şekilde yapılır.

Agar Dilüsyon Yöntemi

Az sayıda antibiyotik kombinasyonu ve çok sayıda bakteri suşuyla çalışılması gereken durumlarda tercih edilebilir. Klasik agar dilüsyon yöntemi izlenir. Her bir antibiyotik solüsyonu petrideki 20 mL agar ile dilüe olacağı için stok solüsyonlar istenen son konsantrasyonun 20 katı yoğunlukta hazırlanır. Agara eklenen her bir antibiyotik solüsyonu miktarı petrideki agar miktarının en çok %5'i kadardır. Agar yüzeyine 10^4 CFU bakteri içerecek spot ekimleri yapılır. Yorumlamalar aynıdır.

ZAMANA BAĞLI ÖLDÜRME KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ (TIME-KILL METHOD, TIME-KILL CURVE)

Checkerboard tekniğinde yalnız inhibisyon verileri elde edildiği halde öldürme eğrisi tekniğiyle, denen kombinasyonun bakterisidal aktivitesi ölçülebilir. Bu nedenle bakterisidal amaçlı tedavi takipleri için daha anlamlı bir yöntemdir. Ayrıca checkerboard yönteminde 16-20 saat sonunda tek ölçüm ya-

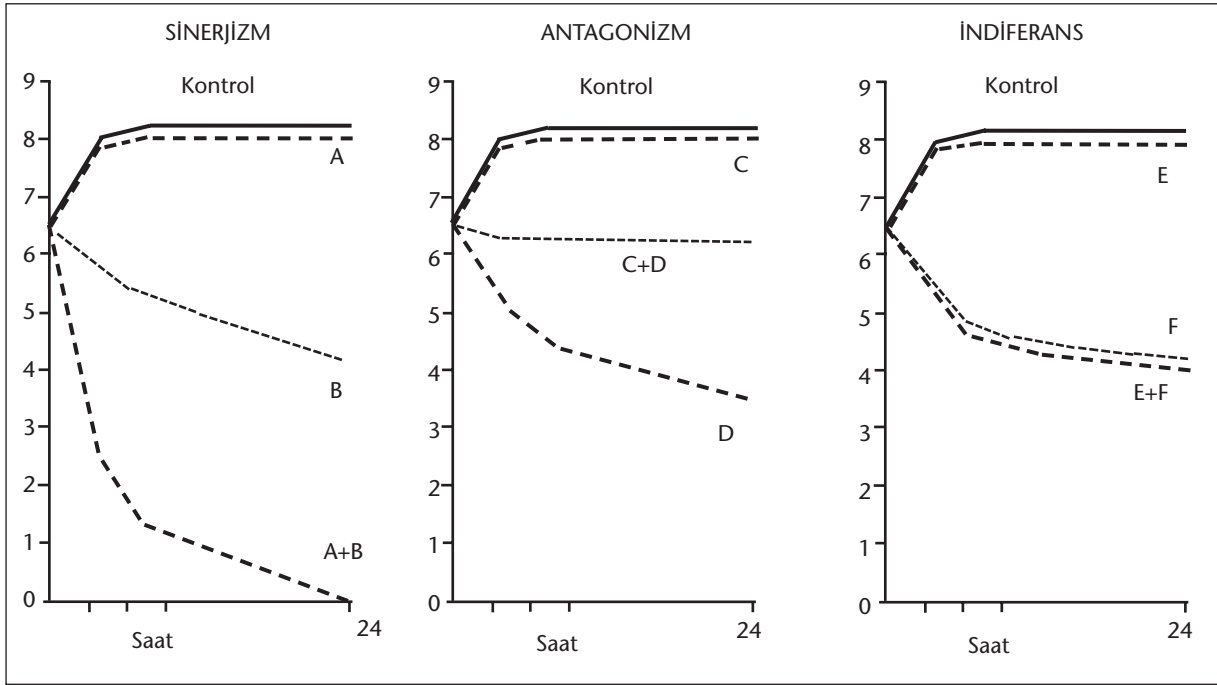


Şekil 5. MİK'in katları olarak iki antibiyotikli kombinasyon sonuçlarının kaydedilişi^[4]

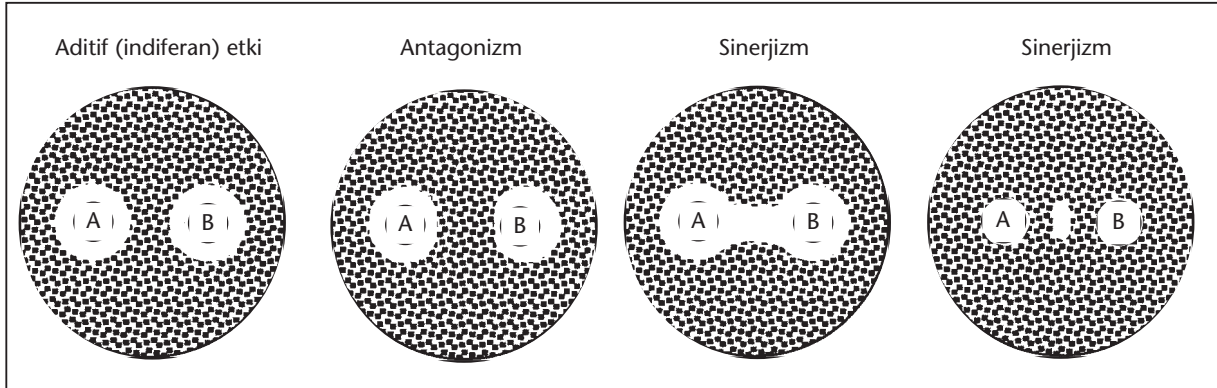
- A: Aditif etki
B: Sinerjizm
C: Antagonizm

Şekil 6. Şekil 5'teki sonuçların izoblogramla gösterilişi^[4]

- D: Aditif etki
E: Sinerjizm
F: Antagonizm



Şekil 7. Zamana bağlı öldürme yöntemiyle ölçülen kombinasyon etkileri^[1]



Şekil 8. Disk tekniğiyle sinerji testi^[1]

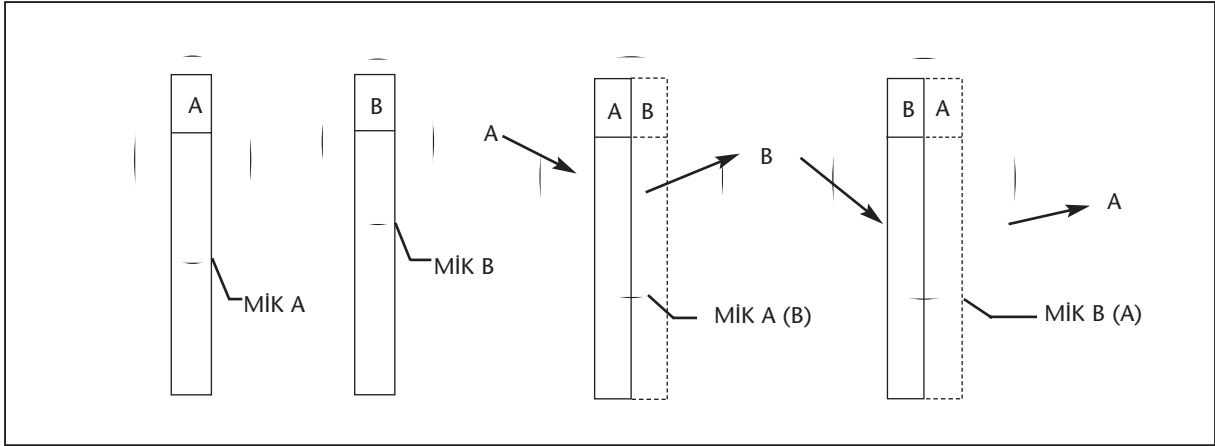
pıldığı halde, bu yöntemde zamanla birlikte değişen etki dinamik olarak gösterilebilmektedir.

En az 10 mL katyon destekli MHB içeren tüplerde veya küçük balonlarda sinerji testi yürütülür. Bakteri inokülümü 5×10^5 CFU/mL'dir. 0., 4., 8., 24. saatlerde kanlı agar plaklarına farklı antibiyotik dilüsyonu içeren her tüp veya balondan 25 µL kadar bir miktar damlatılır. Plakların 24 saat inkübasyonu sonunda oluşmuş bakteri kolonileri sayılıp CFU/mL değerleri bulunur. Antibiyotiğin zaman içindeki öldürme (sidal) etkisinden söz edebilmek için koloni sayısında 24 saatte %99.9 yani 10^3 kat ($3 \log_{10}$) azalma görülmelidir. Denenen iki antibiyotiğin sinerjistik etkisinden söz etmek içinse önce kombinasyondaki antibiyotiklerin daha aktif olanının koloni sayı-

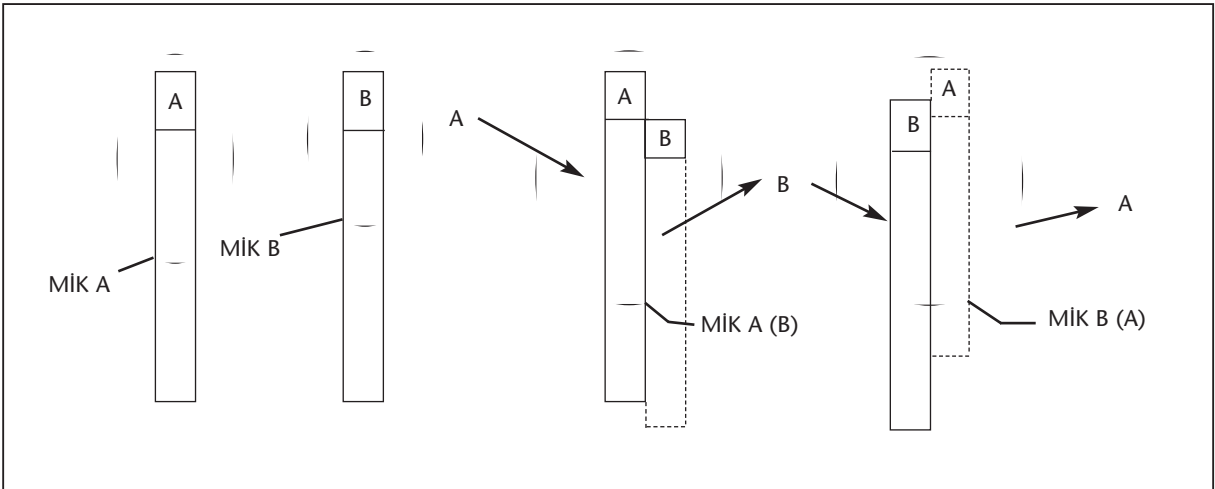
ları kaydedilir. Bu değerlere oranla, kombinasyonun 24 saatlik koloni sayılarında ≥ 100 kat ($2 \log_{10}$) düşüş varsa sinerjiye karar verilir; ≥ 100 kat artış antagonizmi, < 10 kat artış veya azalış ise aditif veya indifferan etkiyi gösterir^[1].

DİSK DİFFÜZYON YÖNTEMİ

Kirby-Bauer yönteminde olduğu gibi 0.5 McFarland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu petriye yayılıp kombinasyon etkisi araştırılan iki antibiyotiğin diskleri yanyana yerleştirilir. Aralarındaki merkezden merkeze uzaklık, her iki disk etrafındaki inhibisyon zon yarıçapları toplamına eşit veya biraz üstünde olmalıdır. 16-18 saat $35-37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon sonunda Şekil 8'de görüldüğü gibi değerlendirilir^[1].



Şekil 9. MİK değerleri önceden bilinmeyen iki antibiyotiğin E test yöntemiyle sinerji testi [5]



Şekil 10. MİK değerleri önceden bilinen iki antibiyotiğin E test yöntemiyle sinerji testi[5]

E TEST YÖNTEMİ

0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu 4 adet MHA plağına yayılır. Kombinasyonu denenecek A ve B antibiyotiklerinin MİK değerleri önceden bilinmiyorsa, Şekil 9'da görüldüğü gibi antibiyotikleri içeren E test stripleri, tek başlarına MİK'lerini saptamak üzere ayrı ayrı birer petriye yerleştirilir. Üçüncü petriye önce B stripi konur ve 1 saat yerinde bırakılır. B stripi steril bir pensle yerinden kaldırılır, aynı iz üzerine gelecek şekilde A stripi konur. Dördüncü petriye A stripi konup 1 saat bekletilir. A kaldırılıp B stripi yine A'nın bıraktığı iz üzerine konur[5]. 35-37°C'de 24 saat inkübasyon sonunda üçüncü petride B'nin varlığında A'nın MİK'i, dördüncü petride A'nın varlığında B'nin MİK'i okunur. Mikrodilüsyon checkerboard yönteminde anlatıldığı gibi FİK değerleri bulunur.

$$FİK_A = \frac{B'nin\ varlığında\ A'nın\ MİK'i\ (3.\ Petri)}{Tek\ başınayken\ A'nın\ MİK'i}$$

$$FİK_B = \frac{A'nın\ varlığında\ B'nin\ MİK'i\ (4.\ Petri)}{Tek\ başınayken\ B'nin\ MİK'i}$$

$$\Sigma FİK = FİK_A + FİK_B$$

$$\Sigma FİK \leq 0.5 \text{ ise sinerjist}$$

$$> 0.5 - < 2 \text{ ise aditif veya indiferan,}$$

$$\geq 2 \text{ ise antagonist etki}$$

söz konusudur (AB Biodisk önerisine göre antagonizm için cut-off değeri olarak $\Sigma FİK \geq 2$ kabul edilmekle birlikte diğer yorumlara göre > 4 değeri tedavi kararları açısından daha doğru bir yaklaşım olarak görülmektedir⁽¹⁾).

SİNERJİ TESTLERİNE GENEL BAKIŞ

Checkerboard Yöntemi

• Mikrodilüsyon checkerboard veya makrodilüsyon yönteminde yalnız bakteri üremesinin inhibisyonuna ait veriler elde edilebilir. Oysa sinerji testi gereken durumlar genellikle bakterisidal etki gerektiren endokardit, menenjit, osteomyelit gibi ciddi seyirli klinik olgulardır. Bakterisidal etki tayini ancak üreme olmayan tüp veya kuyucuklardan örnekleme-yayma yaparak mümkündür fakat bu da testi komplike hale getirir^[4].

• Sonuçlar belirli bir zamanda belirli bir dilüsyon için ya hep-ya hiç ilkesiyle değerlendirilmek zorundadır ki bu, dinamik değerlendirme gerektiren antibiyotik etkisi ölçümüne yalnızca statik olarak yaklaşmak demektir. Bu nedenle checkerboard yönteminin in vivo yanıtla tam uygunluk gösterdiğini söylemek mümkün değildir^[3].

• Antibiyotik dilüsyonları çift kat artış göstererek geometrik seri esasına göre hazırlanır fakat sonuçlar aritmetik skala şeklinde izoblogram ile gösterilir. Geometrik seri sonuçlarının doğru gösterimi için izoblogramın logaritmik versiyonu kullanılabilir fakat o zaman da sinerji-antagonizm-aditif etki ayrımlarını yapmak imkansızlaşır^[7].

• Yöntemin tekrarlanabilirliği konusundaki çalışmalar göstermiştir ki, testin her tekrarında farklı sonuçlar alınabilmektedir. Bu nedenle bir kombinasyon testinde güvenilirliği sağlamak için aynı anda en az beş mikroyütle çalışmalı ve bildirilecek sonuçlara bu şekilde karar verilmelidir^[8].

• Öte yandan checkerboard yönteminde bir avantaj olarak modifikasyonlar yapmak mümkündür ve test sıvı veya agar ortamında, mikro veya makrodilüsyonla, çift kat seri dilüsyon dışında ara dilüsyon eklemeleriyle, ikiden fazla antibiyotikle ve bakteri dışı mikroorganizmalarla da yürütülebilmektedir^[1].

Zamana Bağlı Öldürme Eğrisi

• Uzun ve zahmetli bir çalışma gerektirdiği için ancak az sayıda kombinasyon denenebilir.

• Sinerji tanımlaması (kombinasyondaki en etkili antibiyotiğe oranla kombinasyonun, 24 saatte en az 100 kat daha fazla öldürmesi) yalnız etkili olan antibiyotiğe göre ölçülür ve diğer antibiyotiğin etkisi yok sayılır. Bu varsayım enterokoklar için doğrudur (aminoglikozidlerin tek başına kullanımında enterokoklara etkisiz olmaları) fakat diğer bakterilerin çoğu için geçersizdir^[1].

Disk Yöntemi

• Aynı antibiyotiklerle sinerji testi sıvı ortamda tekrarlandığında farklı sonuçlar alınabilir.

• İndiferans ile sinerjizmi bu yöntemle birbirinden ayırmak zordur.

Sinerji testlerinin kullanım alanları iki ana grupta toplanabilir:

• Yeni bir antibiyotiğin etkisini inceleme gibi araştırma amaçlı,

• Hastane kökenli çoğul dirençli suşlarla oluşan ciddi infeksiyonlar ve risk grubu hastalara yönelik rutin inceleme içinde düşünülmesi gereken durumlarda.

Öncelikle ikinci kullanım alanındaki sonuçlar direkt olarak ve çok kısa sürede hastanın kliniğine yansıtacağı için sinerji testlerinin güvenilirliği önem taşımaktadır. Yaklaşık 20 yıldır kullanılan bu testlerde henüz bir standardizasyon bulunmaması ise bu konudaki en büyük dezavantajdır. En çok kullanılan iki yöntemin, checkerboard ve zamana bağlı öldürme yönteminin, birbiriyle uyuşmayan sonuçlar vermesi sık rastlanabilen bir durumdur^[6]. Çoğul dirençli mikroorganizmalarla infeksiyon prevalanslarındaki artış sonucu doğru antibiyotik tedavisine karar vermede sinerji testleri güçlü bir yer edinebilir, fakat bunun için öncelikle testlerin standardizasyonu ve yöntemlerin optimalizasyonu gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Eliopoulos GM, Moellering RC Jr. Antimicrobial combinations. In: Lorian V (ed). Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th edition, USA: Williams&Wilkins, 1996:330-96.
2. Stratton CW, Cooksey RC. Susceptibility tests: Special test. In: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg ND, Shadomy HJ (eds). Manual of Clinical Microbiology. 5th edition, Washington: ASM, 1991:1153-65.
3. Gülay Z. Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğini ölçen testler. "ADTS Çalışma Grubu (ed). Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı". İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No: 33, 1998: 85-100.
4. Moody JA. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM, 1992: section 5.18.
5. Korenian M. E test practical guide: Synergy testing & antibiotic combinations. AB Biodisk, Solna-Sweden, 1999.
6. Capelletty DM, Rybak MJ. Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:677-83.
7. Hamilton-Miller JMT. Rationalization of terminology and methodology in the study of antibiotic interaction. J Antimicrob Chemother 1985;15:655-8.

8. Rand KH, Houck HJ, Brown P, Bennett D. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:613-5.

Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Çiğdem BAL

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı

Çapa - İSTANBUL

Makalenin Geliş Tarihi: 01.07.1999

Kabul Tarihi: 10.07.1999

flora

İNFEKSİYON HASTALIKLARI ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
DERGİSİ'NE

ABONELİĞİNİZİ YENİLEDİNİZ Mİ?

1999 yılında dergimize abone olan
okuyucularımıza 25 Aralık 1999'a kadar
abone bedeli 12.000.000 TL yerine
8.000.000 TL.

Lütfen aboneliĐinizi yenileyiniz!...

AboneliĐinizi yenileyebilmek için Bilimsel Tıp Yayınevi'nin 106310 nolu posta çeki hesabına 8.000.000 TL yatırıp aboneliğinizi yenilemek istediğinizi belirten kısa bir not ile birlikte posta çeki dekontunun fotokopisini P.K. 99 Cebeci - ANKARA adresine göndermeniz yeterlidir.

İlginiz için teşekkür eder, saygılar sunarız.