ANKEM Derg 7 (No.3):208-212(1993)

ANTİBİYOTİK TEDAVİSİNDE İN-VİTRO TEST/YANIT İLİŞKİSİ, ANTİBİYOTİK SERUM YOĞUNLUĞU/YANIT İLİŞKİSİ

Nedim ÇAKIR

In-vitro test/response and serum concentration/response relationships in antibiotic treatment.

KAPSAM

Bu yazımızda antibiyotik deyimi sadece antibakteriyel antibiyotikler için kullanılmış, antiviral, antimikotik ve antiparaziter ilaçlar ile ilgili konular kapsam dışı bırakılmıştır. Antibiyotik kullanımında in-vitro testler ile antibiyotiklerin klinik uygulamalarındaki farklılıkların önemli bir kaynağı da kültür yöntemlerindeki değerlendirme hatalarıdır. Bu konuda ayrı bir derleme konusu olduğu için bu yazının kapsamı dışında bırakılmıştır.

GENEL KAVRAMLAR

Konuya bir özdeyiş ile başlamak istiyoruz: "Antibiyotik duyarlılık testleri hangi antibiyotiğin kullanılması gerektiğini gösteren testler değil, hangi antibiyotiğin kullanılmaması gerektiğini gösteren testlerdir".

Antibiyotik duyarlılık testleri antibiyotik kullanımında klinik hekimlere yol gösteren en önemli yardımcılardan biridir. Öte yandan yine bu testler, henüz çözümlenmemiş bazı yönleriyle klinik hekimleri ile laboratuvar hekimleri arasındaki en önemli spekülasyon kaynaklarından biridir.

Duyarlılık testlerinin değerlendirilmesi sırasında şu noktaları da daima göz önünde bulundurmak gerekir:

1- Söz konusu etken mikroorganizmanın daha önceki duyarlılık testlerine göre duyarlılık durumu nedir?

2- Etkili olan antibiyotiğin farmakolojik özellikleri nelerdir? (Örneğin, toksisitesi, proteinlere bağlanması, dağılımı, absorbsiyonu, atılımı).

3- Aynı etkene karşı aynı antibiyotik ile alınmış klinik sonuçlar nasıldır?

4- Söz konusu patolojik olayın bu antibiyotiğin kullanımına etkisi nasıl olacaktır?

5- Konağın bağışıklık durumu nasıldır?

Sonuçta klinik hekimin seçeceği antibiyotik ve izleyeceği genel tedavi protokolü, in-vivo ve tercihen in-vitro koşullarda da söz konusu mikroorganizmayı öldürmeli veya üremesini inhibe etmeli; sonuçları da gerek klinik iyileşme gerekse laboratuvarda kültür kontrolları şeklinde izlenebilmelidir. Kuşkusuz antibiyotik seçiminin etik ve moral tüm sorumluluğu klinik hekime aittir. Burada klinik hekim için karar tekniği, kendilerine direnç olmayan antibiyotiklerin antimikrobiyal etkinlik içinde farmakolojik karakteristiklerini kıyaslamak şeklindedir.

Laboratuvarların buradaki rolleri ise standart in-vitro testler aracılığı ile söz konusu etkene karşı uygun antibiyotiklerin etkin olup olmadıklarını araştırmaktır. Halbuki halen kullanılmakta olan antibiyotik duyarlılık testleri kullanılan tüm yöntem ve malzemelere bağlı olarak farklı sonuçlar verebilmekte, bu da karmaşa yaratmaktadır. Test edilen mikroorganizmanın ekim yoğunluğu, inkübasyon süresi, ısı, pH, antibiyotik stabilitesi, kullanılan besiyerinin yapısal özellikleri ve içerdikleri iyon cins ve miktarları bunlardan başlıcalarıdır. Bu nedenle referans yöntemler ve metodolojik standardizasyonlar daima gündemde kalmıştır(4).

Burada duyarlılık testlerinde test-yanıt ilişkisini etkileyen faktörleri yöntemlere göre gözden geçirmeden önce ortak genel kurallara değineceğiz:

1- Hemen tüm yöntemlerde duyarlılık testi mutlaka bir değil birkaç koloni (tercihen beş koloni) ile yapılmalıdır. Bu kural özellikle kaybedilmiş mutasyonlara rastlama olasılığını azaltır. Ayrıca heterorezistan yüksek mutasyon frekansına sahip kökenler daha kolay yakalanır.

2- Yine tüm yöntemlerde besiyeri tamponik karakterde ve fizyolojik pH sınırlarında olmalıdır. Aksi halde besiyerlerindeki büyük farklılıklar sonuçları da etkileyebilir.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir.

3- Her laboratuvar, hizmet kapasitesi yüksek ise hergün, düşük ise en az haftada bir kez standart referans suşlar kullanarak testte kullandıkları yöntemi, besiyerlerini ve antibiyotikleri kontrol etmeli, bu iş için kullandıkları referans suşları da usulüne uygun şekilde saklamalıdır.

4- Testte sınanan antibiyotiklerin cins ve sayılarının seçimi de önemli bir konudur. Çünkü artan teknoloji ile piyasada artan yeni ve eskilerin modifikasyonu antibiyotikler, tümünün birden test edilmesini olanaksızlaştırmıştır. Zaten buna da gerek yoktur. Çünkü aynı grup antibiyotikler arasında çoğu kez benzer duyarlılık kalıpları vardır. Ancak bu grup kavramı maalesef her zaman için geçerli değildir. Örneğin, 3. kuşak sefalosporinler arasında çapraz veya farklı direnç kalıpları olabilmektedir.Biz bu konuda her hastanenin önce antibiyotik kullanım politikasının saptanıp laboratuvarların buna göre antibiyotik gruplandırması yapmasının ve her gruptan temsilci antibiyotikler seçmesinin en doğru yol olduğuna inanıyoruz. Bu seçimlerde toksisite, maliyet/fiyat, farmakokinetik benzerlikler yönlendirici faktörler olmalıdır. Yine bu konudaki önerimiz hastanelerde mikrobiyolog, epidemiyolog, infeksiyon hastalıkları uzmanı, cerrah ve iç hastalıkları uzmanlarından oluşacak bir kurulun antibiyotik kullanım politikasını saptamasıdır.

Klinik hekimlerce hangi antibiyotiklerin seçildiğinin bilinmesi ileride laboratuvar-klinik hekimleri arasında işbirliğini arttırıcı ve hataları minimal düzeye indirici bir faktördür. Bu durum ayrıca test edilecek antibiyotikleri de belirlemede yardımcı olur. Bu seçimde klinik hekim en dar spektrum - en ucuz - en az toksik olanı yeğlemeli, laboratuvar hekimi de bunların yanında pahalı ve geniş spektrumluları da test etmeli, bu sonuçları gerekirse rapor etmelidir. Eğer klinik hekimin o infeksiyon için özel bir isteği varsa bu antibiyotikler de test edilmelidir. Çok özel antibiyotik kullanımlarında mutlaka yukarıda sözü edilen komitenin onayı alınmalıdır.

Yakın etkili gentamisin ve amikasinin duyarlılıkları ayrı ayrı test edilmeli, amikasin rapor edilmemelidir. Ancak, gentamisin dirençli ise amikasin bildirilmelidir.

Barsak bakterileri için:

a) 3. kuşak sefalosporinlerden sadece sefotaksim denenmelidir. Ancak sonuç diğer üçüncü kuşaklar için de geçerlidir.

b) Birden çok dirençli bakteriler için klinikten uyarı beklemeden rutin olarak imipenem duyarlılığı saptanmalıdır.

5- Duyarlılığı test edilecek antibiyotiklerin seçiminde bir önemli belirleyici faktör de söz konusu infeksiyonun yeri ve hastanın durumudur. Teknik elemanlarca bu konuda sıkça hatalar yapılmaktadır. Örneğin, nitrofurantoin veya nalidiksik asid bir abse örneğinden soyutulan bakteriye karşı veya ofloksasin ve siprofloksasin çocuklardan hatta bebeklerden soyutulan mikroorganizmalara karşı yanlış olarak test edilmektedir.

6- Test besiyerlerine eğer gerekirse kan ilave edilebilir. Ancak söz konusu olan fekal streptokokların sefalosporinlere duyarlılığı ise, bu ilave sonuçları değiştirebilmektedir. Bu durumda kan içermeyen besiyerleri kullanılmalıdır.

7- Duyarlılık testlerinde en çok yapılan hatalardan biri de komplikasyonsuz üriner sistem infeksiyonlarına ait sonuçların değerlendirilmesinde ortaya çıkmaktadır. Burada sonuçlar diğer infeksiyonlarda olduğu gibi değerlendirilmektedir. Halbuki çoğu antibiyotik kana oranla idrarda daha yüksek konsantrasyonda birikmekte, böylece testlerde orta duyarlılık sınırlarında görülmesine karşın in-vivo etkin olabilmektedir. Böylece in-vitro sonuçlar hatalı çıkabilmektedir.

8- Klinik hekimlerin laboratuvarlarda en büyük yakınmalarından biri de sonuçların geç çıkmasıdır. Çünkü bu arada in-vivo koşullarda oluşabilen değişiklikler veya ampirik antibiyotik seçimi çıkacak olan in-vitro sonuçları geçersiz kılabilmektedir. Gerçi sonuçların erken çıkmasını sağlayacak kompüterize tanı ve duyarlılık yöntemleri geliştirilmiştir. Ancak bunlar yine de primer kültürden sonra uygulanabilmektedir. Böylece süre minimum 24 saat olmaktadır. O halde yapılması gereken, primer kültür sürelerini azaltmaktır. Bu konudaki "ütopya"larımız örneğin alınmasından hemen birkaç saat sonra sonuçların çıkarılabilmesidir.

Şimdi duyarlılık testlerinde yanıtları etkileyen faktörleri test yöntemlerine göre inceleyebiliriz:

KURU DİSK DİFFÜZYON YÖNTEMİ

Kuru disk diffüzyon yöntemi tüm dünyada yaygın olarak kullanılan ABD'de de FDA ve NCCLS tarafından onaylanan testlerdir(3,4). Yöntem basit olduğu için kolay uygulanabilmektedir. Ancak hemen ilave edelim: Detaylara bazen dikkat etmek gerekir. Çünkü ufak tefek yöntem farklılıkları çıkacak sonuçları etkileyebilmektedir.

1. Kuru disk diffüzyon tekniklerinde mikroorganizmanın üreme hızı, besiyerinin cinsi, kalınlığı ve kullanılan agarın yoğunluğu sonuçları daima etkileyebilmektedir. Bu nedenle yukarıdaki parametrelerden kontrol edilebilir olanlar mutlaka standartlaştırılmış olmalıdır(5).

2. Kuru disk diffüzyon tekniğinde söz konusu olan yeni bir mikroorganizma veya yeni bir antibiyotik ise, tekniğin uygun olup olmadığı diffüzyon yöntemleri ile mutlaka kontrol edilmelidir.

3. Test için besiyeri olarak mutlaka Mueller-Hinton agar veya DST agar kullanılmalı, tercihen 150 mm'lik Petri kutularına 4 mm'lik kalınlıkta dökülmelidir. Her yeni besiyeri kutusu açıldığında standart referans suşlar ile kontrol yapılmalıdır(4).

Hazır besiyerleri nemli ortamda buzdolabında saklanmalı, ekim sırasında besiyeri yüzeyi ve kapağı kuru olmalıdır.

4. Diskler buzdolabında veya derin dondurucuda saklanmalıdır. Her yeni disk partisi mutlaka standart suşlarla test edilmelidir.

5. Test mikroorganizması sıvı besiyerlerinde önce McFarland 0.5 ünitesine kadar üretilmelidir. Daha yoğun veya daha seyreltik mikroorganizmalar hatalı sonuç verebilmektedir.

6. Novobiosin ve nafsilin kanlı DST veya Mueller-Hinton'da test edilmemelidir.

7. *Neisseria meningitidis*'in sulfonamidlere duyarlılığında sonuçlar kuşkuyla karşılanmalıdır. Çünkü daima hatalı sonuçlar çıkabilmektedir. Ayrıca *N.meningitidis*'in diğer antibiyotiklere duyarlılığına da bu yöntemde çok güvenmemek gerekir.

8. Metenamin mandelat ve metenamin hipuratın in-vitro test ile in-vivo yanıt sonuçları arasında uyumsuzluk vardır.

9. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları bazen diffüzyon testlerinde penisilin ve türevlerine duyarlı çıkabilmektedir. Burada in-vitro sonuçlara güvenmeyip dirençli olarak kabul etmek gerekir.

10. Yine MRSA'ların saptanmasında Petri kutuları özellikle 35°C'de tutularak inkübe edilmelidir. 37°C'de yanlış duyarlı sonuç alınabilir. Hatta 35°C'nin kontrolü zor ise deney 30°C'de de yapılabilir. Sonuç gerçekle uyumlu çıkacaktır(2).

11. Metisilin diskleri, stabilizasyonu zor disklerdir. Bunun yerine oksasilin diskleri kullanılabilir.

12. Ko-trimoksazol test edildiğinde her Mueller-Hinton agar kutusu açıldığında *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 veya ATCC 33186) ile 24 mm'lik çap oluşumu test edilmelidir. Bu çap saptanmazsa o kutu ko-trimoksazol için kullanılmamalıdır. *Pseudomonas aeruginosa*'nın gentamisine duyarlılığı araştırılıyorsa ortamda mutlaka 25 mg/l $MgCl_2$ bulunmalıdır(1).

13. Disk diffüzyon yöntemi polimiksinler için uygun değildir. Çünkü agar içindeki diffüzyonları çok kötüdür. Mutlaka makro veya mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmalıdır.

14. *Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae*'nin ampisiline duyarlılıklarının saptanmasında özel bir yöntem ve ölçüler kullanılmalıdır.

15. Test sonuçları 16-18 saatte okunmamalıdır. Erken okumalarda hatalı çaplar oluşabilmektedir.

16. Disk diffüzyon tekniği zor üreyen mikroorganizmalar için uygun değildir. Bu mikroorganizmalar için dilüsyon teknikleri kullanılmalıdır.

17. Değerlendirmede asla inhibisyon zon çapları birbiriyle kıyaslanmamalıdır. Bunlara göre antibiyotik seçimi yapılmamalıdır. En iyisi her disk için çaplar ayrı ayrı standart ölçülere göre kıyaslanmalıdır.

18. Eğer çok gerekliyse (ve örnek florasız ise) örnek test için doğrudan ekim materyali olarak kullanılabilir. Bu yöntem hatalı değildir.

19. Disk diffüzyon tekniği anaerop mikroorganizmalara uygulanamamaktadır.

Herşeye rağmen disk diffüzyon tekniği pratik ancak kalitatif bir yöntemdir. Kolay uygulanabilir olması onu hâlâ en çok uygulanan test konumunda tutmaktadır.

DİLÜSYON YÖNTEMLERİ

Kantitatif sonuç verebilen dilüsyon yöntemleri zaman içinde daha çok başvurulan test çeşitleri olmaktadır. Bu dilüsyon testleri kullanılan besiyerinin sıvı veya katı olmasına göre iki temel gruba ayrılır. Her iki grubun da avantaj ve dezavantajları olabilir. Sıvı dilüsyon deneyleri ya tüpte (makro metod) veya pleytte (mikro metod) yapılabilmektedir. Sıvı dilüsyon yöntemlerinde minimal inhibisyon konsantrasyon (MIC) veya minimal bakterisidal konsantrasyon (MBC) saptanabilmektedir.

1. Sıvı dilüsyon yöntemini uygulayan laboratuvarlar deneyde kullanacakları antibiyotik dilüsyonlarını, bunlara ait stok eriyikleri ve kalite kontrollerini bizzat kendileri yapmalıdır. Bu, testlerin sağlıklı olabilmesi için koşuldur. Dilüsyon yöntemlerinin uygulanmasında en sık yapılan hata, testte kullanılan antibiyotiğin ticari preparatlardan elde edilmesidir. Özellikle bunların oral veya intramüsküler formlarının kullanılması kesinlikle doğru değildir. Deneyler mutlaka katkısız, etkin ham maddeden yapılmalıdır.

2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın aminoglikozit ve polimiksinlere duyarlılıklarında yine kalsiyum ve magnezyum iyonlarının bulunması şarttır. Aksi halde duyarlılık sonuçları farklı olacaktır. Gerekli olan iyon miktarları litreye 50 mg $CaCl_2$ ve 25 mg $MgCl_2$ ilavesi ile karşılanabilir.

3. Antibiyotik sulandırımları dilüsyon yöntemlerinin çok dikkat edilmesi gereken bir aşamasıdır. Sulandırımlar stok eriyikten mutlaka günlük olarak yapılmalıdır. Henüz ülkemizde kullanılmamasına rağmen bazı firmalar kullanıma hazır, sulandırılıp dondurulmuş antibiyotik pleytleri piyasaya çıkarmışlardır. Bu pleytlerin saklanmasında mutlaka soğuk zincir kurallarına uymak gerekir. Kullanmadan önce bu pleytler oda ısısına getirilmeli, bir kez ısınıp erimiş pleytler kullanılmazlarsa tekrar dondurulmamalı, atılmalıdır.

4. Ekim yoğunluğu dilüsyon yöntemlerinde de sonuçları yakından etkileyen bir faktördür. Gereğinden fazla yoğunlukta bakteri oluşturacağı bulanıklık nedeniyle okuma-değerlendirme olanaksızlığı oluşturur. Gereğinden düşük yoğunlukta bakteri ise, bu testin en önemli avantajını yok eder: Düşük frekanslı mutant popülasyonların dirençliliklerinin saptanmasını zorlaştırır. Tüm yöntemler için çukur başına $1x10^4$ bakteri test için en idealdir.

5. Ekim yapılan pleytlerin inkübe edildiği ortam da sonuçların sağlığı üzerine etkilidir. En iyisi 35°C'de 16-20 saat ve hafif nemli ortamda tutmaktır. Kuru ortamlar antibiyotik yoğunluğunu azaltıp sonuçları değiştirir. Aşırı nem ise kontaminasyon riskini arttırır.

6. Sülfonamid duyarlılığının araştırılmasında kullanılan besiyerinin timidinden ve p-amino benzoik asitten arındırılmış olması gerekir. Aksi takdirde gerçekte duyarlı olan kökenler dirençli olarak okunur.

7. Antibiyotik sulandırılmış besiyerlerinin her parti mal ve her stok için en az bir kez sterilite kontrolünün yapılmış olması koşuldur.

8. Değerlendirmede berrak kalan ilk tüp konsantrasyonu MIC olarak kabul edilir. Ancak sulfonamid ve trimetoprimde MIC % 80-90 oranında azalmış canlı bakteri kitlesinin bulunduğu çukurdur.

9. Testin doğru olarak yapılıp okunması için ilk standardizasyon ve sulandırım oranları çok önemlidir. Sulandırımlar 7 serilik yapılmalı ve beklenilen duyarlılık 4. tüpte veya çukurda görünmelidir. 3. veya 5. tüp/çukurlar da kabul edilebilir. Sulandırım standardının ilk veya son tüpe göre ayarlanması test sırasında yanıltıcı sonuçlar çıkarır.

10. Sıvı dilüsyon yöntemlerinde en önemli hata kaynağı kontaminasyon olasılığıdır. Test sırasında ve sonuç aşamasında bunun ortaya konması oldukça zordur.

Agar dilüsyon yöntemi aynen sıvı dilüsyon yöntemi gibidir. Ancak burada antibiyotikli besiyeri Petri kutusuna dökülmüş ve katı vasıflıdır. Sıvı dilüsyon yönteminde söz konusu olan kontaminasyon olasılığı agar dilüsyonda kolayca farkedilir. Bunun dışında sıvı dilüsyon için in-vitro/in-vivo farklılığa neden olabilecek diğer tüm farklılıklar agar dilüsyon için de geçerlidir.

OTOMATİK TESTLER

Kolorimetrik temele dayanan otomatik testler kullanım alanına yeni girmektedir. Bu yöntemlerle oluşan test sonuçlarının tekrar edilebilirlikleri diğer yöntemlerle denenmiş ve olumlu yanıtlar alınmıştır. Otomatik yöntemler iki grup altında incelenmektedir:

a) Bir gece inkübasyona gerek duyanlar

b) Aynı gün sonuç verenler.

Bu iki grup arasında da büyük oranda uyumluluk saptanmaktadır. Ancak burada dikkat edilmesi gereken nokta tüm testlerde ilk birkaç saat içindeki sonuçların aldatıcı olabildiği, bazı antibiyotiklerin duyarlılıklarının saatlerle değişebildiği, bu nedenle yanılmaların önüne geçmek için mutlaka üretici firmanın öngördüğü inkübasyon sürelerine uyulması gerektiğidir.

KLİNİK PROBLEMLER

Bu bölümde bu testlerin klinikte kullanımı üzerinde durulacaktır. Duyarlılık testleri etken olarak saptanan mikroorganizmanın antibiyotiklere duyarlılıkları genel olarak bilinmiyorsa endikedir. Duyarlılığı bilinen A grubu beta-hemolitik streptokok ve *N.meningitidis*'in penisiline karşı duyarlılıklarını test etmeye gerek yoktur.

Duyarlılık testi konusunda yapılabilecek hatalardan biri de normal flora üyelerine ya da patojen olmayan mikroorganizmalara karşı test yapıp antibiyotik kullanmaktır. Bu durumda normal flora baskılanacağı için ekolojik ortam genellikle gerçek patojenlere kalır.

Öte yandan bazan toplumumuzda herhangi bir etkene karşı direnç kalıpları bilinmeden dahi o antibiyotiğe karşı tavır alınabilmektedir. Örneğin, *H.influenzae*'ye karşı ampisilin duyarlılığı saptanmadan başka toplumların rakamlarına bakılarak karşı tutum alınabilmektedir.

Söz konusu edilen bütün bu faktörlere ve olumsuzluklara karşın halen uygulanmakta olan in-vitro testler ile bunların in-vivo sonuçları büyük paralellikler gösterir. Kuşkusuz uygun antibiyotik kullanımının başarısı hem klinik hekimine hem de laboratuvar hekimine ait olacaktır.

KAYNAKLAR

1- Casillas E, Konly M A, Wishow B H, Schoonknecht F D: Effect of ionised calcium and soluble magnesium on the predictability of performance of Mueller-Hinton agar susceptibility testing of Pseudomonas aeruginosa with gentamicin, *Antimicrob Agents Chemother 19*:987 (1981).

2- Ferraro M J: Special considerations in susceptibility testing for gram positive organism, *Antibiyotik Duyarlılık Testleri Temel İlkeleri ve Klinik Önemi Sempozyumu*, Marmaris (1992).

3- Jorgensen J H: Antimicrobial susceptibility testing, *Antibiyotik Duyarlılık Testleri Temel İlkeleri ve Klinik Önemi Sempozyumu*, Marmaris (1992).

4- Lennette E H, Ballows A, Hausler W J, Shadomy H J: *Manual of Clinical Microbiology*, 4. baskı, American Soc. Microbiology, Washington (1985).

5- Reves D S, Phillips I, Williams J D, Wise R: *Laboratory Methods in Antimicrobial Chemotherapy*, Churchill-Livingstone, Edinburgh (1978).