

# Geçmişten Günümüze Antibiyotik Duyarlılık Testleri

## Antibiotic Susceptibility Tests from Past to Present

Ahmet Celal Başustaoğlu\*<sup>✉</sup>, Rifat Vedat Yıldırım\*\*<sup>✉</sup>, Gizem İnce\*<sup>✉</sup>

\*Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

\*\*Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı, Ankara

### Öz

Louis Pasteur (1822-1895), Robert Koch (1843-1910) ve özellikle Paul Ehrlich'in (1854-1915), antibiyotik ışık tutan yayınlanmış çalışmaları bakteriyolojinin ilk yıllarında, inhibe edici maddelerin organizmalar üzerindeki etkilerini gözlemlediklerini göstermektedir. Alexander Fleming'in (1881-1955) 1928'de penisilin ile ilgili yayınları tıp tarihinde bir dönüm noktasıdır. Daha fazla antimikrobiyal bileşik keşfedildikçe, bu antimikrobiallerin kullanımı yoluyla bulaşıcı hastalıkların ortadan kaldırılacağı tahmin edilmiştir. Antimikrobiyal bileşikler keşfedildikçe, bu antimikrobiyal-lerin kullanımı ile bulaşıcı hastalıkların yok edileceği düşünülmüştür. Maalesef, bu antimikrobiyal-lere karşı gelişen bakteriyel direnç bu iyimserliği hızla azalttı ve mikrobiyoloji laboratuvarının bu ajanlara duyarlılığı belirlemek için test yöntemleri geliştirmesine yol açtı. İlk araştırmacılar tarafından, antimikrobiyal duyarlılık testlerinin sonuçlarını etkileyen birçok değişken olduğu hızla anlaşılması ve değişkenlerin standardize edilebilmesi için onlarca yöntem geliştirilmiş ve bu yönde çalışmalar yapılmıştır. Sonuç olarak, bu standardizasyon ihtiyacı, standart antibiyotik duyarlılık test metodolojileri geliştiren birçok organizasyonun oluşturulmasını sağlamış ve günümüzde de bu standartlar kullanılır olmuştur. Bu derlemede, meslektaşlarımıza ışık tutması amacıyla bu yöntemlerin tarihçesi ve gelişimi anlatılmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik duyarlılık testleri, antibiyotik direnci, tarihçe

### ABSTRACT

The published studies of Louis Pasteur (1822-1895), Robert Koch (1843-1910), and especially Paul Ehrlich (1854-1915) referring to antibiosis, shows that in the early years of bacteriology they observed the effects of inhibiting agents on organisms. Alexander Fleming's (1881-1955) publications on penicillin in 1928 was a milestone for medical history. As the antimicrobial compounds are discovered, it is thought that infectious diseases will be eliminated with the use of these antimicrobials. Unluckily, bacterial resistance to these antimicrobials quickly reduced this optimism and led the microbiology lab to develop test methods to determine sensitivity to these agents. Early researchers quickly understood that there were many variables affecting the results of antimicrobial susceptibility tests, and dozens of methods were developed and evaluated to standardize these variables. As a result, the need for standardization has directed many organizations to the production of standard antibiotic susceptibility tests methodologies, which are used today. In this review, the history and development of these methods are summarized to guide our colleagues.

**Keywords:** Antibiotic susceptibility tests, antibiotic resistance, history

### Alındığı tarih / Received:

23.07.2019 / 23.July.2019

### Kabul tarihi / Accepted:

01.10.2019 / 01.October.2019

### Yayın tarihi / Publication date:

31.03.2020 / 31.March.2020

### ORCID Kayıtları

A. Başustaoğlu 0000-0002-2571-0637

R. V. Yıldırım 0000-0001-8982-7239

G. İnce 0000-0002-9012-620X

✉ rvyildirim77@gmail.com

**Atf:** Başustaoğlu AC, Yıldırım RV, İnce G. Geçmişten günümüze antibiyotik duyarlılık testleri. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(1):1-9.

## GİRİŞ

Pasteur, Koch ve özellikle Paul Ehrlich'in, antibiyotik ışık tutan yayınlanmış çalışmaları, bakteriyolojinin ilk yıllarında araştırmacıların, inhibe edici maddelerin organizmalar üzerindeki etkilerini gözlemlediklerini göstermektedir. Özellikle Paul Ehrlich'in Konigliches Enstitüsü müdürü olarak enfeksiyon hastalıklarını

tedavi etmek için yeni kimyasal ajanlar geliştirmeye odaklanan çalışmalarını vurgulamak gerekir<sup>(1,2)</sup>.

İlk kemoterapötik olarak etkili antibiyotik, 1929'da uzun süredir yara enfeksiyonlarının tedavisi ile ilgilenen İngiliz bir bakteriyolog olan Alexander Fleming (1881-1955) tarafından keşfedildi. Kırsal kesimdeki bir tatilden dönerken laboratuvarında tek bir küf

kolonisi tarafından kontamine olmuş bir *Staphylococcus aureus* kültürünü bir yığın petri kabının arasından fark etti. Fleming plağı gözlemlerken, küfü saran kolonilerin saydam olduğunu ve parçalanmaya maruz kaldığını ve küfün, ortamdaki kolonilerin parçalanmasına neden olan bir kimyasal maddeyi ortama salgıladığını düşündü. Gözleminin olası kemoterapötik önemini algılayan Fleming, *Penicillium* spp. olarak tanımlanan küfü izole etti ve kültür süzüntülerinin penisilin adı verilen bir antibakteriyel madde içerdiğini tespit etti. İlk kez üreme inhibisyon alanını gözlemleyerek daha sonra penisilin olarak adlandırılacak maddenin inhibe edici etkisine ilişkin ilk gözlemini yaptı. Bu olay çağdaş duyarlılık testi metodolojilerinin evrimi için başlangıç noktasıdır<sup>(1,2)</sup>.

Fleming tüm uğraşlarına rağmen, penisilini saflaştıramadı, ancak bu hâliyle birçok gram pozitif bakterinin üremesini önlemedeki dikkate değer etkinliğini gösterdi ve hatta insanlarda göz enfeksiyonlarının lokal tedavisi için başarı ile kullandı. Bu arada, sülfonamidler gibi diğer antibiyotik olmayan bileşiklerin kemoterapötik etkinliği keşfedilmişti ve penisilin saflaştırılmasındaki zorluklarla cesareti kırılan Fleming, bunun üzerinde daha fazla çalışmayı bıraktı<sup>(1,2)</sup>.

On yıl sonra, H.W. Florey (1898-1968) ve E. Chain (1906-1979) penisilin çalışmasına devam etti. Kısmen saflaştırılmış malzemeyle yapılan klinik çalışmalar çarpıcı bir şekilde başarılı oldu. Ancak bu zamana kadar, İngiltere savaştaydı; penisilin endüstriyel gelişimi, birçok laboratuvar da yoğun bir araştırma ve geliştirme programının başlatıldığı Amerika Birleşik Devletleri'nde yapıldı. Üç yıl içinde, penisilin endüstriyel ölçekte üretiliyordu<sup>(1,2)</sup>.

Öncelikle gram pozitif bakterilerin neden olduğu bazı bakteriyel enfeksiyonlar üzerine penisilin belirgin kemoterapötik etkinliği, yeni antibiyotikler üzerinde yoğun araştırmalara neden olmuştur. Yeni antibiyotikler keşfedildikçe, enfeksiyonlara karşı mücadelenin sonuna gelindiği düşünülüyordu. Ne yazık ki ortaya çıkan direnç ile bu iyimserlik hayal kırıklığına dönüştü. Tedavide başarısızlıkların ortaya çıkması, direncin

belirlenmesi için yöntemler geliştirilmesine yol açtı. Öncelikle penisilin üzerine yapılan çalışmalar ile günümüzdeki in-vitro test kavramı gündeme geldi ve modern antimikrobiyal duyarlılık test metodolojisinin temelini oluşturdu. Daha sonraki yıllarda antimikrobiyal duyarlılık testinin gelişimi üzerine birçok yazar tarafından çok çeşitli çalışmalar yayınlandı<sup>(1,3)</sup>.

Bu makalemizde, rutinde uyguladığımız antibiyotik duyarlılık testlerinde hâlen sıklıkla kullandığımız bazı yöntemlerin tarihini ve gelişimini, ulaşabildiğimiz makalelerden yola çıkarak derlemeyi amaçladık. Ayrıca bu konuda ülkemizde yapılmış çalışmalardan bazıları örnek olarak sunulmuştur. Bu tarihsel veriler ile elde edilen deneyimlerin ileride yapılacak birçok araştırmaya ışık tutacağını düşünüyoruz.

### Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Tarihsel Gelişimi

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının sorumlulukları arasında, enfeksiyon hastalıklarında etken bakterinin izole edilmesi, tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri (ADT) uygulayarak tedavide klinisyene yol gösterici olmak yer almaktadır. Bir septik hastanın yaşamı tehdit eden durumu ve hastanelerde antibiyotiğe dirençli bakterilerin artan prevalansı göz önüne alındığında, doğru, güvenilir ve hızlı yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Hâlen günümüzde yaygın olarak kullanılan disk difüzyon, agar dilüsyon, gradyent şerit test, sıvı dilüsyon ve otomatize test sistemleri hakkında yapılmış bazı çalışmalardan örnekler aşağıda tarihsel gelişim sırasıyla yer almaktadır. Gelişmekte olan "Multiplexed automated digital microscopy", "Single-cell morphological analysis", "Celloscope", "BacterioScan FLLS", "Life Scale Microchannel Resonator", "Genefluidics", "AFM Cantilever", "Flow Cytometry" gibi yeni geliştirilen veya geliştirilmekte olan ve rutin kullanıma henüz girmemiş olan tekniklerden burada sözedilmeyecektir<sup>(4)</sup>.

- 1874; William Roberts (1830-1899), "Studies on biogenesis" isimli makalesinde *Penicillium glaucum* küfünün içinde büyüdüğü sıvı besiyerinin bakteri ile kolayca kontamine olmadığını gözlem-

ledi (Philosophical Transactions of the Royal Society of London). Lechevalier ve Solotorobsky'nin "Three Centuries of Microbiology, 1965" isimli kitaplarında mikrobiyolojinin ilk yıllarında araştırmacıların bazı maddelerin bakteriler üzerine inhibe edici etkileri ve organizmalar arasındaki inhibe edici etkileşim üzerine çalıştıklarını belirtmektedir<sup>(1,2,5)</sup>.

- 1889, Beijerinck (1851-1931) tarafından farklı toksinlerin bakteriyel gelişim üzerindeki etkisini incelemek için agar difüzyon tekniği kullanıldı<sup>(1,2)</sup>.
- 1924, Fleming bir test çözeltilisinin antimikrobik niteliklerini değerlendirmek için "ditch plate" tekniğini geliştirdi. Agar yüzeyine test edilecek organizmayı ekip, agar üzerine açtığı kanal içine test edeceği solüsyonu koyup inkübasyondan sonra hendek etrafındaki inhibisyon alanını gözlemledi<sup>(1,2,6)</sup>.
- 1929, Reddish, agara hazneler açıp bu hazneleri antiseptik çözeltilerle doldurarak Fleming'in 1924'te uyguladığı tekniği değiştirdi. Bu tekniğin prensibi, "Oxford cup", "fish spine" veya "Heatley cup" ile eş anlamlı disk plakaları ile daha da geliştirilmiştir<sup>(1,2,6,9)</sup>. Bu teknik, çağdaş minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) metodolojisinin öncüsü olarak tanımlanmıştır. Fleming 1942 yılında, bulanıklık yerine pH'ı indikatör olarak kullanarak sıvı dilüsyon tekniğini geliştirdi<sup>(2,7,8)</sup>.
- 1940, Heatley (1911-2004) duyarlılığı değerlendirmek için test edilecek antibakteriyel madde emdirilmiş emici kâğıtları kullandı. Penisilin içeren filtre kâğıdı diskleri ilk kez Vincent ve Whitgrove Vincent tarafından kullanılmıştır<sup>(1,2,10)</sup>. Bu yöntemin iş yükünü ve zamanı azaltacağını ve daha verimli sonuçlar alınacağını savunmuşlardır. Aynı yayında Hobby (1910-1993) ve ark.'nın 1942 yılında plak yönteminde besiyeri derinliğinin, kuruluğunun ve bakterilerin lag fazında olmalarının dezavantaj yarattığı yorumları yer almaktadır<sup>(1,2,9)</sup>.
- 1940, Schmith ve Reymann, ilk kez agar dilüsyon yöntemini sulfapiridin etkinliğini gonokoklar üzerinde test ederek uyguladılar<sup>(1,2)</sup>.
- 1940, Gardner, bulanıklık yerine organizmadaki morfolojik değişimleri son nokta olarak kullandığı

bir sıvı dilüsyon tekniği kullandı. Bu yöntem, antibiyotik sonrası etkiyi değerlendirmek için kullanılan günümüz yöntemlerinin öncüsü sayılabilir<sup>(2)</sup>.

- 1941, Abraham ve ark.<sup>(2)</sup>, agara yerleştirilen bir silindirin içine antimikrobiyal maddeleri koydu ve buradan agara yayılmasını sağladı. ABD'de bu silindirler penisilin silindirleri olarak tanımlanmıştı ve çeşitli antimikrobiyal maddeleri değerlendirmek için popüler bir test yöntemi hâline geldi.
- 1942, Fleming yukarıda belirttiği gibi bulanıklık yerine pH'ı indikatör olarak kullanarak sıvı dilüsyon tekniğini geliştirdi<sup>(2,8)</sup>. Birçok araştırmacı bu yöntemi çeşitli şekillerde kullandılar. Genel olarak bu uygulama başarılı olmadı ancak ileride geliştirilen Alamar sistemine ışık tuttu.
- 1942, Rammelkamp ve Maxon, Schmidt ve Sesler gibi araştırmacılar sıvı dilüsyon tekniği üzerine çalışmalarını yayınladılar<sup>(1,2)</sup>.
- 1945, Mohs, 15 mm çapında diskleri olan bir "radyal ekim disk yöntemi" tanıttı. Bu, bir test organizmasının aynı plak üzerinde hassas bir kontrol ile karşılaştırılmasının ilk uygulanmasıydı. Bu yöntem, yakın zamana kadar İngiltere'de birçok laboratuvar da hâlâ kullanılan Stokes tekniğinin öncüsü olarak tanımlanmıştır<sup>(1,2,11)</sup>.
- 1945, Copeland, Morley gibi diğer araştırmacılar da aynı yıl disk yönteminde teknik değişiklikler yaptılar<sup>(2)</sup>.
- 1945; Frisk, *Streptococcus pneumoniae*'nin duyarlılığını test ederken penisilin agar içerisine katılmasını tanımladı. Daha sonra Frank ve çalışma arkadaşları çok sayıda antibiyotik-organizma kombinasyonunun incelenmesi için agar dilüsyonunu kullandılar. Bu dönemde yapılan çalışmalar ile agar difüzyon ve agar dilüsyon teknikleri uygun şekilde uygulandığında benzer sonuçlar elde edildiği ancak agar dilüsyonun zahmetli ve zaman alıcı olduğu görüldü<sup>(1,2,12)</sup>. Yöntem, seri dilüsyonların organizmaları dirençli ve duyarlı kategorilere ayıran bir veya daha fazla kritik konsantrasyon ile değiştirilmesiyle basitleştirildi. Bu yöntem ilk kez Ericsson ve Sherris tarafından kullanılan ve günümüzde yaygınlaşan bir terim olan sınır değer "break point" tekniği olarak anılır.

İkinci Dünya Savaşı'nın sonunda, penisilin birçok bulaşıcı hastalığın tedavisi için yaygın kullanımı nedeniyle tüp dilüsyon, disk difüzyon yöntemleri ve agar dilüsyon yöntemlerinin hepsi, penisilin duyarlılığının kesin olarak tahmin edilmesi için geçerli yöntem olarak kabul edildi. Bu dönemde, hem Gram pozitif hem de Gram negatif enfeksiyonları tedavi etmek için tasarlanmış yeni antimikrobiyal ajanların kullanımı başlamış ve ilaçların sayısı arttıkça, duyarlılığı tahmin etme ve belirli bir enfeksiyonu tedavi etmek için en uygun ajanları seçme gereksinim artmış bu da pratik metodoloji kullanarak duyarlılığı veya direnci ortaya koymak için yenilikçi yaklaşımları beraberinde getirmiştir<sup>(1,2)</sup>.

- 1946, Garrett, agar dilüsyon testini gerçekleştirmek için çok sayıda replikasyon cihazı geliştirdi ve duyarlılığı değerlendirmek için çok sayıda seri dilüsyon kullanımı yerine kritik dilüsyonlar konseptini ortaya koydu<sup>(2)</sup>.
- 1947, Hoyt ve Levine, emdirilmiş filtre kağıdı yerine penisilin içeren tabletleri kullanan bir teknik geliştirdiler ve bu metodla penisilin ve streptomisin duyarlılıklarını çalıştılar<sup>(6,13)</sup>.
- 1947, Bugün hâlâ yaygın olarak kullanılan çeyrek inçlik (6-6.5 mm) filtre kağıdı diskleri ilk olarak 1947'de Bondi ve ark. tarafından tanımlandı<sup>(2,14)</sup>.
- 1950, Frank, Wilcox ve Finland birçok antibiyotik-organizma kombinasyonu için agar dilüsyon yöntemini denediler<sup>(2,15)</sup>.
- 1952, Gould ve Bowie disk difüzyon tekniği ile çeşitli konsantrasyonlardaki diskleri kontrol organizmaları ile karşılaştırdılar<sup>(1,2)</sup>.
- 1952, Szybalski ve ark., agar dilüsyon yöntemleri üzerine çeşitli çalışmalar yaptılar<sup>(1,2)</sup>.
- 1954, Jackson ve ark., antibiyotik duyarlılığını belirlemek için indikatör olarak hemogloblin kullanımını geliştirdiler<sup>(1,2,16)</sup>.
- 1955, Stokes bilinen izolatlar ile klinik izolatları diskler ile plak üzerinde karşılaştırdığı ve kendi ismini taşıyan yöntemi sundu. Bu yöntem tüm Avrupa'da yaygın olarak kullanılmıştır<sup>(1,2)</sup>.
- 1959, Steers, Foltz ve Graves, diğer birkaç uygulama ile agar dilüsyon yöntemini basitleştiren ve

hâlâ kullanılan bir replikasyon cihazını geliştirdiler<sup>(2)</sup>.

- 1959, Bauer, Roberts ve Kirby tek disk, çoklu disk ve plak dilüsyon tekniklerini yayınladılar. Bu yöntemleri, daha sonra Kirby Bauer duyarlılık testi yöntemi olarak bilindi<sup>(2,17)</sup>.
- 1959, Ericsson ve ark., duyarlılık testleri ve klinik yorumlanması üzerine çalışmalar yayınladılar<sup>(1,18)</sup>.
- 1960, Steers ve ark.<sup>(2)</sup>, agar difüzyon ve dilüsyon tekniklerini karşılaştıran çalışmalar yaptı. Neredeyse eşzamanlı olarak, Anderson ve Troyanosky düşük etkili diskler kullanan başka bir standart disk tekniği tanıttı.
- 1963, Tolhurst, Buckle ve Williams, zahmetli dilüsyon aralığını kullanmak yerine birçok ilacın belirli bir klinik izolatta test edilmesini sağlamak için, kritik sınır değerleri çevreleyen dilüsyonlara odaklanarak, tüp dilüsyon tekniğini değiştirmede önemli ilerleme kaydetmiştir<sup>(2)</sup>.

Bu dönemde rutin bakteri izolatları için agar dilüsyon ile MİK tahminlerinin yapılmasının çok zaman alıcı ve zahmetli olduğu kabul edilmiş, ancak çoklu replikasyon cihazları ile yapılan seri dilüsyonlar, organizmaları dirençli ve duyarlı kategorilere ayıran bir veya daha fazla kritik konsantrasyon ile değerlendirerek basitleştirilmişti. Bu yöntem ilk olarak Ericsson ve Sherris tarafından kullanılan bir terim olan "sınır değer" "breakpoint" tekniği olarak adlandırılmaktadır. Kırılma noktası tekniğinin yaygın kullanımı, bilinen miktarlarda, önce filtre kağıdı petlerinde ve daha sonra filtre kağıdı şeritlerinde mevcut olan antimikrobiyal madde ile kolaylaştırılmıştır.

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'daki çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarı, bakterilerin antimikrobiallere duyarlılığını belirlemek için farklı besiyerleri, inokulum konsantrasyonları, inkübasyon süreleri, inkübasyon sıcaklıkları ve farklı antimikrobiyal konsantrasyonlar kullanarak farklı yöntemler uyguladılar<sup>(1-3)</sup>. Bu konuda birçok araştırmacı, yöntemde çeşitli karışıklıklara neden olan birçok farklı protokoller yayınladı ve bu testlerin sonuçlarını etkileyen birçok değişken olduğu hızla anlaşıldı. Sonuç

olarak, bu tekniklerin standardizasyonuna gereksinim duyulduğuna dair (1950'lerin sonlarından itibaren) bir tartışma başladı. Bu gereksinim, birçok kuruluşun standartlaştırılmış ADT metodolojileri geliştirmelerine yol açmıştır. 1959'dan başlayarak, duyarlılık testini standartlaştırma gereksinimi belirgin hâle geldi ve bazı kuruluşlar ve araştırmacılar bu kritik konuyu ele almaya başladı<sup>(1-3)</sup>. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), antimikrobiyal duyarlılık testi metodolojisinin standardizasyonu konusunu ele aldı ve bir rapor yayınladı<sup>(18)</sup>.

- 1966, Bauer, Kirby ve ark., bu konudaki yayınları kapsamlı olarak gözden geçirip, birleştirip güncellediler ve disk difüzyon tekniğini pratik bir yöntem olarak kurma girişimlerini yayınladıkları zaman, disk difüzyon metodunun standartlaştırılmasında önemli ilerleme kaydedildi<sup>(1,2,20)</sup>.
- 1971, Ericsson ve Sherris, duyarlılık testi yöntemlerini değerlendirmek için DSÖ'nün sponsor olduğu, ADT'nin 10 yıllık Uluslararası İşbirliği Çalışması sonuçlarını yayınladılar<sup>(21)</sup>. Bu çalışma, büyük ölçüde Ericsson ve meslektaşları tarafından tanımlanan disk difüzyon yöntemine dayanıyordu. Diğer birçok araştırma ADT metodolojisini standart hâle getirmek için bu ilk girişimleri takip etti. Bu dönemde Avrupa'da, ADT için en az altı farklı sistem kullanılmaktaydı. 1972 yılında Stokes ve Waterworth'ün çalışmaları, duyarlılık testini standartlaştırma girişimlerine büyük katkı sağlarken 1973 yılında Haltalin, Markley ve Woodman, agar dilüsyonda kritik sınır değerler üzerine çalışmalar yaptılar<sup>(2)</sup>.
- 1975, Bauer ve Kirby'nin yayını<sup>(20)</sup>, tek bir antimikrobiyal disk ile duyarlılık testi için standart bir prosedür geliştirilmesine zemin hazırladı ve 1974 yılında, Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi ("National Committee for Clinical Laboratory Standards", NCCLS) tarafından geçici standardın yayınlanmasına zemin oluşturdu<sup>(22)</sup>. Daha sonra, 1975 yılında, aynı kuruluş tarafından onaylanmış standart yayınlandı<sup>(23)</sup>. Sonuçta, disk difüzyon duyarlılık testi için standart bir prosedür elde edildi ve bundan sonra Kirby-Bauer disk

difüzyon testi olarak adlandırıldı. Kirby-Bauer disk difüzyon duyarlılık testinin amacı, klinisyene tedavi seçeneklerini seçmesine yardımcı olmak için patojenik aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin çeşitli antimikrobiyal bileşiklere duyarlılığını veya direncini belirlemektir<sup>(1-3)</sup>.

- 1975 sonrası her ne kadar bazı yazarlar, disk difüzyon teknikleri kullanılarak elde edilen sonuçları hızlandırıcı metodları tanımlamış olsalar da, kullanılan yöntemler esas olarak 18 ila 24 saat inkübasyona dayanmaktaydı. Ayrıca, düşük emek girdisine sahip hızlı yöntemler için klinik ve ekonomik baskılar, alternatif ADT yöntemlerinin geliştirilmesine neden olmuştur. Bu dönemde klinik mikrobiyoloji ve klinik biyokimya gibi dallardaki diğer uygulamalarda olduğu gibi antibiyotik duyarlılık testlerinde de gittikçe artan şekilde hata payını, maliyeti, süreyi ve özellikle iş yükünü azaltan otomasyon uygulamaları gündeme geldi<sup>(1-3)</sup>.

Bactec (Becton Dickinson, ABD) sisteminin kan kültürü otomasyonundaki başarısı, otomasyonun klinik mikrobiyolojideki geçerliliğini arttırdı. Bu dönemde, bilgisayarların birçok laboratuvarı veri işlemedeki başarısı klinik mikrobiyolojinin bu gerekli modernleşmeye uyum sağlaması gerektiği algısını yaratmada önemli bir faktördü. Ne yazık ki disk difüzyon yöntemi, otomasyona olanak vermediği için dilüsyona dayalı otomatize antimikrobiyal test sistemleri, algılanan çoğu sorunun çözümü gibi görünüyordu<sup>(1-3)</sup>.

İlk otomatik ADT yöntemlerinden biri, Pfizer Diagnostics (Almanya) tarafından pazarlanan ve tanımlanan "Autobac disc elution" sistemi idi. Bu sistem, bazı sonuçların 4-6 saatte rapor edilmesini sağladı. Antimikrobiyal duyarlılık testi alanında devrim yapma potansiyeline sahipti, ancak temel dezavantajlarından biri, bir organizma tanımlama sistemine sahip olmaması idi. 1975'e kadar, bu yeni hızlı otomatize sisteme olan ilgi, bu yeni aracın klinikte ne gibi bir rol oynayacağına odaklandı<sup>(1-3)</sup>. Yukarıda da belirtildiği gibi aynı yıl (NCCLS), onaylanmış Antimikrobiyal Duyarlılık Test Standartlarını yayınladı<sup>(23)</sup>. Bu, duyarlılık testi metodolojisini standartlaştırmaya yönelik

daha önceki girişimlerin çoğunu ortak noktada birleştirdi ve ilk kez klinik laboratuvarlar tarafından benimsendi.

- 1977, ikinci otomatik sistem, 1977'de tanıtılan Abbott MS-2 (ABD) Sistemi idi. Bu sistem dört saatte sonuç veren bir sistemdi, bir organizma tanımlama bölümü içeriyor ve MİK değerlerini hesaplıyordu. Bunu kısa bir süre sonra, 1977'de McDonnell Douglas Corporation (ABD) tarafından sunulan AMS Sistemi takip etti ve bu sistem, bugün Vitek (BioMérieux, Fransa) Sistemi olarak bilinen sistemin öncüsü oldu. Bu sistem kapalı plastik kartlarda kurutulmuş reaktifler kullanmakta ve duyarlılık testi ve organizma tanımlaması için ayrı kartlar içermekteydi. Bu üç sistem sonraki yirmi yılda hâkim olacak olan otomatize sistemlerin öncüsü oldular. Gelecekte otomatik duyarlılık testi metodolojisinin öncü rol oynayabilecek teknolojik bir yenilik olması nedeniyle, 1977 yılı duyarlılık testi alanında da önemli bir yıldır. Daha sonra 1981 yılında İsveç Standardizasyon Grubu, 1984 yılında da Alman Standardizasyon Grubu ve daha sonra Fransa Mikrobiyoloji Derneği ilk kez standartlarını yayınladı<sup>(1-3)</sup>.
- 1977, Thornsberry ve ark.<sup>(2)</sup>, duyarlılık testini gerçekleştirmek için standartlaştırılmış mikrotitre plaklarının piyasaya sürülmesine öncülük yaptı.
- 1978, Phillips ve ark.<sup>(2)</sup>, bu uygulamayı temel alarak ilk önce dondurulmuş paneller, daha sonra liyofilize panelleri geliştirdi. Bu paneller, aynı inokulumdan organizma tanımlayabiliyor ve MİK değerlerini saptayabiliyordu. Ticari olarak üretilen bu panellerin otomatik değerlendirilmesi bir sonraki mantıklı adımdı ve tüm diğer teknolojik gelişmeler gibi, bu yeni teknoloji de hızla gelişti. Bu teknolojinin uygulanması, Micro-Media Systems (ABD), Sensititre (Trek Diagnostics, İngiltere), BBL Sceptor (Becton Dickinson, ABD), TouchScan (Dade Behring, ABD), AutoScan (Dade Behring, ABD) ve mevcut MicroScan WalkAway (Bekman Coulter, ABD), VITEK (BioMérieux, Fransa) ve Phoenix (Becton Dickinson, ABD) gibi yarı otomatize/otomatize sistemlerin geliştirilmesine yol açtı. Teknolojideki bu gelişmelere rağmen,

disk difüzyon metodolojisi, ekonomik olması, kolay uygulanması gibi özellikleri ile kullanılabilirliğini sürdürmüştür.

- 1986, Krogstad ve Moellering 1953 yılında Elion ve ark.'nın anti kanser ilaçlarda kullandıkları dama tahtası ("checkerboard") yönteminin bakterilere uyarlanması üzerine çalıştılar. Seyreltme testi, performans, standardizasyon ve yorumlamada sorunlar olmasına rağmen, birçok ilaç için in-vitro sinerjinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanıldı<sup>(2,24)</sup>. Sonuçlar, kombinasyonların sinerjik, additif veya antagonistik olarak sınıflandırılmasını sağlamaktadır.
- 1987, iki katlı dilüsyon şeması üzerine Horrevorts ve ark.<sup>(25)</sup> tarafından alternatif bir yöntem önerildi. *S. aureus*'a karşı rifampin ve minosiklin kullanılarak bir dizi çalışma yaptılar.
- 1988, Stabilize ve kurutulmuş ilacın sürekli konsantrasyon gradyanını taşıyan ince bir reaktif şeridinden uygulanan gradyent şerit testi, agar ortamı üzerindeki antimikrobiyal ajanların minimum inhibitör konsantrasyonunu belirlemek için geliştirilen yeni bir in-vitro yöntem olarak ilk kez 1988'de Los Angeles'taki "Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)" Kongresinde sunuldu<sup>(26)</sup>. Eylül 1991'de gradyent şerit test, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onayını aldıktan sonra dünya çapında bir MİK testi olarak kullanıma girdi<sup>(3)</sup>. 1950'lerde AB BIODISK'in (İsveç) bilimsel kurucusu Hans Ericsson (Karolinska Enstitüsü), disk difüzyon yöntemini standart hâle getirmek, yinelenebilirliğini ve güvenilirliğini geliştirmek için bir dizi çalışma yaptı. Disk difüzyon test sonuçlarından gelen inhibisyon zon çaplarını, referans agar seyreltme yöntemine dayanan MİK değerleriyle karşılaştırdı. Zon çapları ve MİK değerleri arasındaki korelasyon, regresyon analizi kullanılarak değerlendirildi.
- 1998, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) tarafından standartize edilen tüm duyarlılık teknikleri, izole

edilmiş bakterileri fenotipik olarak test etmeye dayanmaktadır. Her ne kadar bu fenotipik duyarlılık test teknikleri nispeten basit olsa da bakteriyel izolasyon gerektirirler ve bu nedenle duyarlılık testi sonucu örnek alındıktan yaklaşık iki gün sonra elde edilebilir. Bergeron ve Ouellette 1998 yılında, duyarlılık profili elde etmek için genellikle birden fazla yöntemin yapılması gerektiği gerçeği gibi, duyarlılık testine fenotipik yaklaşımın diğer eksikliklerine dikkat çekti ve direnç testinin genotipik yaklaşım ile doğrulanması gerektiğini vurguladı<sup>(1,27)</sup>. Direnç testinin hızını ve güvenilirliğini arttırmak için, genotipik bir yaklaşımın kullanımını savunuldu ve bakteriyel direnç genlerinin belirlenmesi için çok sayıda DNA bazlı analiz geliştirildi. Bu yaklaşım gerçek bir devrim olarak tanımlanmış olmasına rağmen, direnç mekanizmalarının ve ilgili genlerin iyi bir şekilde anlaşılmasını gerektirmektedir. Birçok araştırmacı bu yöntem için kısıtlamaları da vurgulamaktadır, çünkü bir direnç geninin varlığı her zaman dirençli bakterilerin göstergesi olmayabilir ve bunun tersine, bir antibiyotiğe direnç kodlayan bir gen belirlenmezse, bakterilerin o belirli maddeye duyarlı olduğu anlamına gelmeyebilir<sup>(2,3)</sup>.

Yeni bir binyıla girerken, rutin tanısal klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmakta olan çoğu ADT metodolojisi, ilk olarak yirminci 20. başında açıklanan tekniklere dayanacaktır. Bu yöntemlerin sınırlamaları anlaşılırsa ve prosedürler standartlaştırılırsa, üretilen sonuçlar duyarlılığa, uygun maliyetli bir şekilde güvenilir bir rehber sunacaktır. Yeni, genotipik direnç test yöntemlerinin rutin kullanım için pratik olması ve rutin testler için değerlendirilmeden önce rekabetçi bir şekilde fiyatlandırılması gerekir. Ayrıca, karışık bir popülasyondaki farklı patojenler veya klinik önemi olmayan organizmalar hakkında rapor vermekten kaçınmak için direnç geni taşıyan organizmanın tanımlanması gerekir. Bu sayede, onlardan yarar görmeyecek hastalarda antibiyotiklerin kullanılmasını engelleyerek bakteriyel direnç riskini azaltabilirler.

Halen, Amerika Birleşik Devletleri'nde CLSI, Avrupa'da EUCAST, Kirby ve Bauer'ın orijinal prosedürünün küresel bir uzlaşma süreci boyunca güncellenmesinde ve değiştirilmesinde öncülük yapmaktadırlar.

### Ülkemizdeki Durum

Ne yazık ki yukarıda bahsettiğimiz dönemdeki teknolojik gelişmelere destek olan bir çalışma ülkemizde yapılmamış, çalışmalar yalnızca duyarlılık testlerinin uygulanması ile sınırlı kalmıştır. Kocagöz ve ark.<sup>(28)</sup> tarafından geliştirilen ve 4-6 saatte sonuç alınabilen "Quicolor Yöntemi" (Salubris, Türkiye) bu konuda ülkemizde geliştirilen tek yöntem olmuştur. Bu yöntemin Amerikan Patent Dairesi'nden 6.265.182 B1 sayılı ve 24 Temmuz 2001 tarih ile patenti alınmıştır<sup>(28)</sup>.

Ülkemizde yapılan ilk duyarlılık çalışmalarına örnekler [Milli Kütüphane (MK)] aşağıda sunulmuştur:

1. Zeki Tolgay (1946). Yeni antibiyotik ve antibakteriyel maddeler hakkında. Türk Veteriner Hekimleri Derneği Dergisi. 16(10) 84/89. MK Yer No 1960 SA 105
2. Nureddin Onur (1949); Streptomycine'e karşı tali mukavemet ve tüberküloz kliniği. İstanbul, 1949 (Kader Matbaası) Milli Kütüphane Yer No 1949 AD 1880
3. Gören Sadık (1949). Bakteriyostatik ve antibiyotik ilaçların karşısında serum ve aşuların durumu. Türk Hij. ve Tec. Biol. Dergisi. 9(1)1949. Milli Kütüphane Yer No 1974 SA 165
4. Çintan Mefkure (1952). Streptomycin rezistansı. İst. Ün. Tıp Fak. Mec. 15(3) 1001/1010, 1952. Milli Kütüphane Yer No 1952 AD 1742
5. Razi Maner, (1953) Koch basilinin streptomycin'e karşı mukavemetinin tetkikinde yeni bir usul / Kader Basımevi, 1953. Milli Kütüphane Yer No. 1953 AD 1884
6. Özdem Anğ, Kurtuluş Töreci (1961) 214 bakteri suşunun spiramycin'e hassasiyetlerinin denemesi/(İstanbul: İsmail Akgün Matbaası) 849-855. Milli Kütüphane Yer No 1961 AD 3561
7. Enver Tali Çetin, Özdem Anğ, Edip Önöz, Kurtuluş Töreci (1960) 1958-1959 senelerinde izole ettiği-

miz 405 bakteri suşunun sulfamidlere hassasiyetlerinin denenmesi. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 23(3).1960.

8. Enver Tali Çetin ve ark. (1960) 1958 ve 1959 senelerinde izole ettiğimiz 405 bakteri suşunun antibiyotiklere ve furadantin'e hassasiyetlerinin denenmesi. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi 23(1-2) 1.1960, 143 - 169. Milli Kütüphane Yer No: 1956 SA 254
9. Özdem Anđ; (1962) Mukavim Neisseria gonorrhoeae suşlarının izole edildiği üretritlerin artışı. 10. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Serbest tebliğ, 1962.
10. Enver Tali Çetin; (1962) Antibiyotiklere mukavim bakterilerde hastane enfeksiyonlarının çoğalmasının önemi, Yeni Tıp Alemi Dergisi, 11;105, 1962
11. Necmettin Alkış (1962) Muhtelif bakterilerin antibiyotiklere hassasiyetleri ve bu hususta kullanılan testlerin mukayesesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 22(2-3) 1.1962, 144-156. Milli Kütüphane Yer No: 1974 SA 165
12. Razi Maner, (1963) Antibiyotik Test Hakkında Bazı Mütalaalar. Hastane 6(8) 8.1952, 328-332. Milli Kütüphane Yer No. 1963 SA 75
13. Enver Tali Çetin, (1963) Bakterilerin antibiyotiklere mukavemeti Yeni Tıp Alemi Dergisi, 133; 7, 53-68, 1963 Milli Kütüphane Yer No: 1963 AD 4313
14. Hakkı Bilgehan, (1964) Drog Rezistans, Antibiyogram ve Klinik Değerlendirilmesi. Ege Tıp Cemiyeti Mecmuası 2(1) 6.1964, 34-41. Milli Kütüphane Yer No. 610
15. Enver Tali Çetin, Özdem Anđ, Kurtuluş Töreci, Önder Ağbaba (1967) 1964-1965 yıllarında izole ettiğimiz 1521 bakteri suşunun antibiyotiklere hassasiyeti. Tıp Fakültesi Mecmuası, 29; 4, 588-602 1967. Milli Kütüphane Yer No. 1967 AD 5055
16. Enver Tali Çetin, Özdem Anđ, Kurtuluş Töreci (1970) 1968-1969 Yıllarında İzole Ettiğimiz 1333 bakteri suşunun antibiyotiklere hassasiyeti. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi 33(4) 1.1970, 615 - 628. MK Yer No. 1956 SA 254

Antibiyotikler, buldukları günden bu yana insanla-

rın elini enfeksiyonlara karşı önemli ölçüde güçlendirmiştir. Patojenler de her yeni çıkan antibiyotiğe karşı direnç mekanizmaları geliştirerek kendilerini savunmuşlardır. Ne yazık ki bugüne kadar bulunan tüm antibiyotiklere karşı farklı bakterilerde de olsa bir direnç gözlenmiştir. Bu konunun mikrobiyoloji dünyasının en çok araştırma yayınlanan konusu olduğunu ve bundan dolayı, bu tarihsel veriler ile elde edilen deneyimlerin ileride yapılacak birçok araştırmaya ışık tutacağını düşünüyorum.

#### KAYNAKLAR

1. Wheat PF, Spencer RC. The evolution of in-vitro antimicrobial susceptibility techniques. J Antimicrob Chemother. 1988;22(5):579-82. <https://doi.org/10.1093/jac/22.5.579>
2. Poupard JA, Rittenhouse SF, Walsh LR. The evolution of antimicrobial susceptibility testing methods. Adv Exp Med Biol. 1994;349:3-14. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9206-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9206-5_2)
3. Isenberg HD. Antimicrobial susceptibility testing: A critical evaluation. J Antimicrob Chemother. 1988;22(Suppl A): 73-86. [https://doi.org/10.1093/jac/22.supplement\\_a.73](https://doi.org/10.1093/jac/22.supplement_a.73)
4. Syal K, Mo M, Yu H, et al. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. Theranostics. 2017;7(7):1795-805. <https://doi.org/10.7150/thno.19217>
5. Roberts W. Studies on biogenesis. Philos Trans R Soc London. 1874;164:457-77.
6. Fleming A. A comparison of the activities of antiseptics on bacteria and on leucocytes. Proc Roy Soc Lond [Biol]. 1924; 96(674):171-80.
7. Reddish GF. Methods of testing antiseptics. Transl Res. 1929;14(7):649-58.
8. Fleming A. In vitro tests of penicillin potency. Lancet. 1942;239(6199):732-3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)70368-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)70368-0)
9. Heatley NG. A method for the assay of penicillin. Biochem J. 1944;38(1):61-5. <https://doi.org/10.1042/bj0380061>
10. Vincent JG, Whitgrove Vincent H, Morton J. Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. Proc Soc Exp Biol Med. 1944;55(3):162-4. <https://doi.org/10.3181/00379727-55-14502>
11. Mohs FE. A simple quantitative test for the penicillin sensitivity of bacteria: the 'radial streak' method. Transl Res. 1945;30(9):800-2.
12. Frisk AR. Bestämning av penicillin koncentration och



- penicillinkänslighet. *Nordisk Medicin*. 1945;28:2249-52.
13. Hoyt RE, Levine MG. A method for determining sensitivity to penicillin and streptomycin. *Science*. 1947;106(2747):171.  
<https://doi.org/10.1126/science.106.2747.171>
  14. Bondi A, Spaulding EH, Smith DE, Dietz CC. A routine method for rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. *Am J Med Sci*. 1947;213(2):221-5.
  15. Frank PF, Wilcox, C, Finland M. In vitro sensitivity of coliform bacilli to seven antibiotics; penicillin, streptomycin, bacitracin, polymycin, aerosporin, aureomycin, and chloromycetin. *J Lab Clin Med*. 1950;35(2):188-204.
  16. Jackson JLW, Dye WE, Mitchell RB. Use of haemoglobin indicator for rapid method of determining antibiotic sensitivity of microorganisms. *Texas Rep Biol Med*. 1954;12:171-2.
  17. Bauer AW, Roberts CE Jr, Kirby WM. Single disc versus multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing. *Antibiot Annu*. 1959-1960;7:574-80.
  18. Ericsson H, Svartz-Malmberg G. Determination of bacterial sensitivity in vitro and its clinical evaluation. *Antibiot Chemother*. 1959;6:41-77.  
<https://doi.org/10.1159/000386647>
  19. WHO. World Health Organization. Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Tests. Second Report of the Expert Committee on Antibiotics. WHO Technical Report Series, No. 210. WHO, Geneva; 1961.
  20. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45(4):493-6.
  21. Ericsson H, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*. 1971;217:Suppl 217:1.
  22. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards Sub-committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Tentative performance standards for antimicrobial susceptibility tests as used in clinical laboratories. In: Balows A (Eds): *Current Techniques for Antibiotic Susceptibility Testing*. 1974.
  23. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard M2-A7. ASM-2. NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova: PA; 1975.
  24. Krogstad D, Mollering RC Jr. Antimicrobial combinations. In: Lorian V (Ed.) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986:537-95.
  25. Horrevorts AM, de Ridder CM, Poot MC, et al. Checkerboard titrations: the influence of the composition of serial dilutions of antibiotics on the fractional inhibitory concentration index and fractional bactericidal concentration index. *J Antimicrob Chemother*. 1987;19(1):119-25.  
<https://doi.org/10.1093/jac/19.1.119>
  26. Bölmström A, Arvidson S, Ericsson M, Karisson A. A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms. 28<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Los Angeles 1988:1209.
  27. Bergeron MG, Ouellette M. Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 1998;36(8):2169-72.
  28. Kocagöz T, Ercis S, Darka Ö, Salmanzadeh-Ahrabi S, Kocagöz S, Haşçelik G. Quicolor: A novel system for rapid antibacterial susceptibility testing. *Ann Microbiol*. 2007;57:131-5.  
<https://doi.org/10.1007/BF03175062>