

**PSEUDOMONAS AERUGINOSA'YA KARŞI İN VİTRO ANTİBİYOTİK  
HASSASİYET ÇALIŞMALARINDA İNOKULUM  
KONSANTRASTASYONUNUN ETKİSİ**

**THE EFFECT OF INOCULUM CONCENTRATION ON ANTIBIOTIC  
SUSCEPTIBILITY TESTS AGAINST PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

**Pınar ZARAKOLU<sup>\*</sup>, Nilay ÇÖPLÜ<sup>\*\*</sup>, Engin GÜVENER<sup>\*\*\*</sup>**

**Özet:** Broth dilüsyon metodu kullanarak, 19 *P. aeruginosa* izolatına karşı antipseudomonal antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonları belirlenmiştir.  $10^5$  ve  $10^8$  olmak üzere iki farklı konsantrasyonda inokulum kullanılarak, inokulum konsantrasyonunun in vitro antibiyotik duyarlılık testlerine etkisi gösterilmeye çalışılmıştır. MIC değerlerine dayanarak ve Howard B.J. (1) breakpointleri kullanılarak inokulum yoğunluğunun etkisi gösterilmiştir. İnokulum konsantrasyonlarının MIC değerlerine etkisi amikacin ve aztreonam'da en fazla, mezlocillin, ticarcillin, piperacillin, cefotaxim, cefoperazone, netilmicin, tobramycin, gentamicin'de orta derecede, ciprofloxacin ve carbenicillin'de en az derecede izlenmiştir.

**Summary:** Using a broth microtiter dilution method, the minimum inhibitory concentrations of antipseudomonal antibiotics were determined against 19 *P. aeruginosa* isolates. Two different concentration of inoculum,  $10^5$  and  $10^8$ , were used to show the inoculum concentration effect of in vitro antibiotic susceptibility tests. On the basis of the MIC values and using Howard B.J. (1) breakpoints, the effect of inoculum density was most prominent for amikacin and aztreonam, intermediate for mezlocillin, ticarcillin, piperacillin, cefotaxim, cefoperazone, netilmicin, tobramycin, gentamicin, and least apparent for ciprofloxacin and carbenicillin respectively.

---

\* As. Dr., Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü.

\*\* Uzm. Dr., Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü.

\*\*\* Uzm. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü.

## G İ R İ Ő

*In vitro* antibiyotik hassasiyet testleri disk diffüzyon ve dilüsyon hassasiyet testleri olarak ayrılır. Dilüsyon hassasiyet testi agarda veya sıvı besiyerinde yapılır. Bazı durumlarda dilüsyon hassasiyet testi gereklidir. Bu durumlar şunlardır: Yavaş üreyen mikroorganizmalar, besin veya çevre faktörleri açısından nazlı olan mikroorganizmalar ve toksik bir antimikrobiyal ajanın kontrolünün gerektiği durumlardır. Dilüsyon hassasiyet testinin değerlendirilmesi minimum inhibitör konsantrasyonun (MIC) saptanması şeklindedir. MIC, antimikrobiyal ajanın organizmanın üremesini gözle görülür şekilde inhibe ettiği en düşük konsantrasyondur (1-5). Bu testte sonucu etkileyen faktörlerden biri de inokulum konsantrasyonudur. İki farklı konsantrasyonda inokulum kullanılarak yapılan çalışmada bu etki gösterilmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çeşitli klinik örneklerden yapılan çalışmalardan 19 adet *Pseudomonas aeruginosa* izole edildi. İdentifikasyon koyun kanlı agarda hemoliz yapması, koloni morfolojisi, oksidaz pozitif olması ve aromatik kokusu ile yapıldı.

Antibiyotiklerin hazırlanması:

Antibiyotikler mezlocillin, amikacin, cefoperazone, carbenicillin, tobramycin, ciprofloxacın, netilmicin, ticarcillin, cefotaxim, piperacillin, aztreonam, gentamicin, sulperazon olarak belirlendi (1, 6). Antibiyotiklerin potensi bilinen toz hali kullanıldı. Stok solüsyon steril distile suda konsantrasyonu 1280 µg/ml olacak şekilde hazırlandı.

Stok solüsyon için şu formülden yararlanıldı:

$$\frac{\mu\text{g/ml (istenen konsantrasyon)} \times \text{Volum (ml)}}{\text{Antimikrobik ajanın potensi } (\mu\text{/ml)}} = \text{Antimikrobiyal ajanın ölçülecek ağırlığı (mg)}$$

Stok solüsyonlar - 20°C'de en çok 30 gün saklandı. Kullanılacağı zaman sıvı besiyerinde 4/5 oranında sulandırılarak 1024 µg/ml konsantrasyonuna ulaşıldı. Sıvı besiyeri olarak Mueller-Hinton kullanıldı (1, 2).

Besiyerinin hazırlanması:

Besiyeri olarak Calcium-Magnesium eklenmiş Mueller-Hinton broth kullanıldı. Önce Mueller-Hinton broth hazırlandı. Otoklavda steril edildi. Mg<sup>++</sup> stok solüsyonu 836 mg MgCl<sub>2</sub> . 6H<sub>2</sub>O 10 ml deiyonize distille su içinde eritildi. Bu solüsyonda 10 mg/ml Mg<sup>++</sup> değerine ulaşıldı. Ca<sup>++</sup> stok solüsyonu 367.5 mg CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O 10 ml deiyonize distile suda eritildi. 10 mg/ml Ca<sup>++</sup> değerine ulaşıldı. Her iki solüsyon filtreden geçirilerek steril edildi ve +4°C'de saklandı. Bu solüsyonlar Mg<sup>++</sup> 25 mg/ml, Ca<sup>++</sup> 50 mg/ml olacak şekilde soğumuş sıvı Mueller-Hinton'a eklendi (1, 2).

## P. AERUGINOSA DUYARLILIK ÇALIŞMALARI

### MIC Platelerinin hazırlanması:

Her izolat için iki grup plate hazırlandı.

Steril 0.05 ml'lik pipet kullanılarak U veya V platelerin her bir çukuruna bir damla broth konuldu. Her izolat için inokulum ve broth kontrol çukurları ayrıldı. Steril 0.05 ml'lik pipetle her sütunun ilk çukuruna denenecek antibiyotiklerin solüsyonu konularak seri dilüsyonları yapıldı. Böylece iki kat katlanan dilüsyonları elde edildi (1, 2).

### İnokulumun hazırlanması:

Kanlı agarda bir gece bekletilmiş taze kültür kullanıldı. Mueller-Hintona pasajlanan inokulum 4-6 saat inkübe edildi.

Birinci grup plate için McFarland 0.5 ( $1 \times 10^8$  CFU/ml)'e ayarlanan inokulum kullanıldı.

İkinci grup plate için  $1 \times 10^5$  CFU/ml'e dilüe edilen inokulum kullanıldı.

Steril 0.05 ml'lik pipetle tüm çukurlara inokulum konuldu. Besiyeri kontrolüne inokulum konmadı. Sonuç olarak antibiyotik konsantrasyonları 256  $\mu\text{g/ml}$ 'den 0.125  $\mu\text{g/ml}$ 'ye ulaştırıldı. Platelerin yüzeyi kapatılarak 18-24 saat inkübe edildi.

Her sıra için görülebilir şekilde üremenin inhibe olduğu (turbiditenin izlenmediği) en düşük konsantrasyon o antibiyotiğin o izolat için MIC değeri olarak kabul edildi.

Optimal tedavi ile ulaşılan konsantrasyon o antimikrobiyal ajanın breakpoint düzeyini verir (2). Bu düzeyler temel alınarak, antibiyotiklerin duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildikleri konsantrasyonlar Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1  
Antibiyotiklerin Duyarlı ve Dirençli Olarak Değerlendirildikleri  
MIC Değerleri (1)

Antimikrobiyal Ajan	MIC Değerleri ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Dirençli ( $\mu\text{g/ml}$ )	Duyarlı ( $\mu\text{g/ml}$ )
Mezlocillin	$\geq 256$	$\leq 64$
Amikasin	$\geq 32$	$\leq 16$
Cefoperazone	$\geq 64$	$\leq 16$
Carbenicillin	$\geq 512$	$\leq 128$
Tobramycin	$\geq 8$	$\leq 4$
Ciprofloxacin (3)	$\geq 8$	$\leq 4$
Netilmicin	$\geq 32$	$\leq 12$
Ticarcillin	$\geq 128$	$\leq 64$
Cefotaxime	$\geq 64$	$\leq 8$
Piperacillin	$\geq 256$	$\leq 64$
Aztreonam	$\geq 32$	$\leq 8$
Gentamicin	$\geq 8$	$\leq 4$

## B U L G U L A R

İn vitro antibiyotik duyarlılık testlerinde inokulum konsantrasyonunun etkisini görmek amacıyla yapılan çalışmanın bulguları aşağıdaki tabloda sunulmuştur.

Tablo 2

Sırasıyla,  $10^5$  İle  $10^8$  Konsantrasyonlarındaki İnokulum İle Yapılan İn Vitro Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları Karşılaştırmalı Olarak Sunulmuştur

İnokulum Konsantrasyonu	Duyarlı Bakteri (%)		Az Duyarlı Bakteri (%)		Direnci Bakteri (%)	
	$10^5$	$10^8$	$10^5$	$10^8$	$10^5$	$10^8$
Antimikrobiyal Ajan						
Mezlocillin	75	0	10	0	15	100
Amikacin	90	5	0	0	10	95
Cefoperazone	75	10	5	0	20	90
Carbenicillin	32	5	0	10	68	85
Tobramycin	63	10	0	0	37	90
Ciprofloxacin	85	47	0	0	15	53
Netilmicin	75	10	0	0	25	90
Ticarcillin	79	5	0	0	21	95
Cefotaxim	79	10	16	5	5	85
Piperacillin	84	10	0	0	16	90
Aztreonam	90	10	0	0	10	90
Gentamicin	58	5	0	0	42	95

## T A R T I Ş M A

İn vitro testlerin sonuçları birçok etkenle değişebilmektedir. Örneğin inokulum miktarı, bakterinin üreme hızı, inkübasyon periyodu, besiyerinin içeriği ve kullanılan antibiyotığın stabilitesi gibi (2). Bu çalışmada inokulum konsantrasyonunun etkisi gösterilmeye çalışılmıştır.

Kullandığımız antibiyotiklerin MIC değerleri  $10^8$  inokulum konsantrasyonunda  $10^5$  konsantrasyonundan daha yüksek bulunmuştur. İnokulum konsantrasyon farkı, duyarlılık yüzdesine etkisi açısından incelenmiştir. Duyarlılık yüzdeleri arasındaki fark amikacin'de ve aztreonam'da en yüksek düzeyde bulunmuştur. Amikacin'de  $10^5$  konsantrasyonda duyarlılık % 90 iken,  $10^8$  konsantrasyonda % 5 bulunmuştur. Aralarında % 85 oranında bir fark izlenmiştir. Aztreonam'da bu fark % 80'dir. Orta derecede etkilenen antibiyotikler sırasıyla mezlocillin % 75, ticarcillin % 74, piperacillin % 74, cefotaxim % 69, cefoperazone % 65, netilmicin

## P. AERUGINOSA DUYARLILIK ÇALIŞMALARI

% 65, tobramycin % 53 ve gentamicin % 53'lük bir yüzde farkı göstermiştir. En az yüzde farkı gösterenler ise ciprofloxacin % 38 ce carbenicillin % 27 şeklindedir.

İnokulum konsantrasyon farklı üzerinde çalışan bazı yazarların bulgularına göre, inokulum konsantrasyonundan en çok etkilenen antibiyotikler piperacillin ve cefoperazone, orta derecede etkilenenler ceftazidime, ticarcillin ve amikacin, en az etkilenenler ise ciprofloxacin, aztreonam, carbenicillin, gentamicin ve tobramicindir (4).

Bir antibiyotiğin belirli bir türe karşı etkili olduğunu söyleyebilmek için suşların en az % 50'sinin, enfeksiyon bölgesindeki veya kandaki ortalama konsantrasyondan düşük MIC değerlerine sahip olması gerekmektedir (3). Optimal tedavi ile ulaşılan konsantrasyon o antimikrobiyal ajanın breakpoint düzeyini verir (2). Howard B.J.'de belirtilen breakpoint düzeylerine dayanarak saptanan duyarlılık yüzdeleri Tablo 2'de gösterilmiştir (1). Tablo 2'de sunulduğu üzere  $10^5$  dilüsyonda inokulum kullanıldığında carbenicillin dışındaki tüm antibiyotiklerin etkili olduğu saptanırken,  $10^8$  dilüsyonda hiçbir antibiyotiğe karşı % 50'den fazla suş duyarlılık göstermemiş, bir başka deyişle hiçbir antibiyotik etkili bulunmamıştır.

Bu çalışmada inokulum konsantrasyonunun antibiyotik hassasiyet testi üzerindeki etkileri gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Howard BJ, Klaas J, Rubin SJO, Weissfield AS, Tilton RC: Antimicrobial Susceptibility Testing. p. 121-154. In Tilton RC, Howard BJ (ed), Clinic and Pathogenic Microbiology, 1987, The C.V. Mosby Company, St. Louis. Washington D.C. Toronto.
2. Finegold SM, Baron EJ: In Methods for Testing Antimicrobial Effectiveness. p. 173-186, Diagnostic Microbiology, 1986, 7th ed. The C.V. Mosby Company, St. Louis. Toronto. Princeton.
3. Ansorg R, Müller KD, Wiora J: Comparison of inhibitory and bactericidal activity of antipseudomonal antibiotics against *P. aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Chemotherapy, 36: 222-229, 1990.
4. Chow AW, Wong J, Bartlett KH: Cross resistance of *P. aeruginosa* to ciprofloxacin, extended spectrum beta-lactams and aminoglycosides and susceptibility to antibiotic combinations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Aug. p. 1368-1373, 1989.
5. Mathur DR, Lawande RV: Antibiogram of *P. aeruginosa* strains isolated from Zaria, Nigeria. Publ. Hlth, Lond. 99, 2: 110-112, 1985.
6. Akalın E: Antibiyotikler Temel Bilgiler ve Klinik Kullanımları. 1989, 1st ed. Türk Tabipler Birliği Yayınları, Ankara.