

Dama Tahtası Sinerji Testi Sonuçlarının Farklı Yöntemlerle Yorumlanması Sonuçlarımızı Etkiliyor mu?

Do Different Interpretative Methods Used for Evaluation of Checkerboard Synergy Test Affect the Results?

Ayşe Gül ÖZSEVEN¹, Emel SESLİ ÇETİN¹, Levent ÖZSEVEN²

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta.

¹ Suleyman Demirel University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Isparta, Turkey.

² T.C. Sağlık Bakanlığı, Kurtuluş Aile Sağlığı Merkezi, Isparta.

² Ministry of Health of Turkey, Kurtulus Family Health Center, Isparta, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 23.11.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 14.02.2012

ÖZET

Son yıllarda hastane enfeksiyonlarına neden olan bazı bakterilerin çoklu ilaç direnci göstermesi nedeniyle klinisyenlerce kombinasyon tedavilerinin tercih edilmesi, araştırmacıların ilgisini klinisyenlerin tercih ettiği ilaç kombinasyonlarının etkinliğini in vitro olarak araştırmaya yönlendirmiştir. Antibiyotik kombinasyonlarının etkinliklerinin test edilmesinde kullanılan standart yöntemlerden biri olan dama tahtası (checkerboard) yöntemi, araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilen, mikrodilüsyon esasına dayanan sinerji testlerinden biridir. Bu testin standardize edilmiş bir uygulama yöntemi olmasına rağmen, sonuçların değerlendirilmesinde araştırmacılar tarafından kullanılan pek çok farklı yorumlama yöntemi vardır. Çoklu ilaç direnci fenotipindeki bakterilerle dama tahtası yöntemi kullanılarak yapılmış birçok çalışmada çeşitli antibiyotik kombinasyonları için farklı sinerjistik etkileşim oranları bildirilmektedir. Bu farklılıkların suşlara ait özelliklerden kaynaklanıyor olabileceği ileri sürülebilir. Ancak hemen hemen aynı özellikleri taşıyan bakterilerle aynı ilaç kombinasyonlarının dama tahtası yöntemiyle test edildiği farklı çalışmalarda da farklı düzeyde sinerji oranları bildirilmektedir. Sinerji oranlarındaki bu farklılıkların çalışmaların birçoğunda farklı yorumlama yöntemlerinin kullanılmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda özellikle yoğun bakımdaki hastalarda gözlenen hastane enfeksiyonlarında etken olarak karşımıza sıklıkla çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter baumannii* çıkmaktadır. Bu nedenle çoklu ilaç direnci gösteren *A.baumannii*, kombinasyon çalışmalarına en çok konu olan etkenler arasındadır. Bu çalışmada, *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla tercih edilen imipenem ve ampisilin/sulbaktam ile meropenem ve ampisilin/sulbaktam kombinasyonlarının çoklu ilaç direnci gösteren 34 *A.baumannii* izolatu üzerindeki etkinliği in vit-

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Ayşe Gül Özseven, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 246 211 2065, **E-posta (E-mail):** agozseven@gmail.com

ro olarak dama tahtası sinerji yöntemiyle test edilmiştir. İmipenem, meropenem ve ampisilin/sulbaktamın minimum inhibitör konsantrasyonu (MK) değerleri mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Daha sonra iki farklı ilaç kombinasyonunun etkinliği 4 x MK ve 0.03 x MK dilüsyon aralığında, 96 kuyucuklu plak üzerinde test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilen dört farklı yorumlama yöntemi kullanılarak ayrı ayrı belirlenmiştir. Böylece farklı değerlendirme yöntemleriyle sinerjistik, tanımlanamayan ve antagonistik etkileşimlerin oranlarının ne derecede etkilendiğini belirlemek amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan her iki kombinasyon için yorumlama yöntemleri arasındaki farklılıklar kare analizi ile test edilmiştir. Her iki kombinasyon için de sinerjistik ve tanımlanamayan etkileşim oranlarının tespiti açısından dört yöntem arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p < 0.0001$). Her iki kombinasyonla da en yüksek sinerji oranları, kombinasyon plağındaki üreme olmayan tüm kuyucuklar taranarak, en düşük fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu indeksinin hesaplandığı kuyucuğun değerlendirmeye alınması yöntemiyle elde edilmiştir. Antagonizmayı tespit etmede dört yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Sonuç olarak standart bir uygulama prosedürüne sahip olmasına rağmen, dama tahtası testi, yorumlama yöntemlerindeki farklılıklar nedeniyle standart sonuçların elde edilmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle testin yorumlama yöntemlerinin standardize edilmesinin gerekliliği kaçınılmazdır. Bunun için, en uygun yorumlama metodunu belirlemek adına, "time-kill" yöntemi gibi diğer standart kombinasyon testlerinden elde edilen uyumlu sonuçların karşılaştırıldığı ve ayrıca sinerjistik etkileşim gözlenen kombinasyonlardan elde edilen klinik yararların araştırıldığı ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: Dama tahtası sinerji testi; değerlendirme yöntemleri; *Acinetobacter baumannii*.

ABSTRACT

In recent years, owing to the presence of multi-drug resistant nosocomial bacteria, combination therapies are more frequently applied. Thus there is more need to investigate the in vitro activity of drug combinations against multi-drug resistant bacteria. Checkerboard synergy testing is among the most widely used standard technique to determine the activity of antibiotic combinations. It is based on microdilution susceptibility testing of antibiotic combinations. Although this test has a standardised procedure, there are many different methods for interpreting the results. In many previous studies carried out with multi-drug resistant bacteria, different rates of synergy have been reported with various antibiotic combinations using checkerboard technique. These differences might be attributed to the different features of the strains. However, different synergy rates detected by checkerboard method have also been reported in other studies using the same drug combinations and same types of bacteria. It was thought that these differences in synergy rates might be due to the different methods of interpretation of synergy test results. In recent years, multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* has been the most commonly encountered nosocomial pathogen especially in intensive-care units. For this reason, multi-drug resistant *A.baumannii* has been the subject of a considerable amount of research about antimicrobial combinations. In the present study, the in vitro activities of frequently preferred combinations in *A.baumannii* infections like imipenem plus ampicillin/sulbactam, and meropenem plus ampicillin/sulbactam were tested by checkerboard synergy method against 34 multi-drug resistant *A.baumannii* isolates. Minimum inhibitory concentration (MIC) values for imipenem, meropenem and ampicillin/sulbactam were determined by the broth microdilution method. Subsequently the activity of two different combinations were tested in the dilution range of 4 x MIC and 0.03 x MIC in 96-well checkerboard plates. The results were obtained separately using the four different interpretation methods frequently preferred by researchers. Thus, it was aimed to detect to what extent the rates of synergistic, indifferent and antagonistic interactions were affected by different interpretation methods. The differences between the interpretation methods were tested by chi-square analysis for each combination used. Statistically significant differences were detected between the four different interpretation methods for the determination of synergistic and indifferent interactions ($p < 0.0001$). Highest rates of synergy were observed with both combinations by the method that used the lowest fractional inhibitory concentration index of all the

non-turbid wells along the turbidity/non-turbidity interface. There was no statistically significant difference between the four methods for the detection of antagonism ($p > 0.05$). In conclusion although there is a standard procedure for checkerboard synergy testing it fails to exhibit standard results owing to different methods of interpretation of the results. Thus, there is a need to standardise the interpretation method for checkerboard synergy testing. To determine the most appropriate method of interpretation further studies investigating the clinical benefits of synergic combinations and additionally comparing the consistency of the results obtained from the other standard combination tests like time-kill studies, are required.

Key words: Checkerboard synergy testing; interpretation methods; *Acinetobacter baumannii*.

GİRİŞ

Hastane kaynaklı enfeksiyonlardan gün geçtikçe artan düzeyde çoklu ilaç direnci gösteren etkenlerin izole ediliyor olması, kombine antibiyotik tedavilerini zorunlu kılmaktadır. Bu durum, araştırmacıların ilgisini, klinisyenlerin tercih ettiği ilaç kombinasyonlarının etkinliğini in vitro olarak araştırmaya yönlendirmiş ve son yıllarda konu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Antibiyotik kombinasyonlarının etkinliklerinin test edilmesinde kullanılan yöntemlerden biri olan dama tahtası (checkerboard) yöntemi, araştırmacıların sıklıkla tercih ettiği mikrodilüsyon esasına dayanan sinerji testlerinden biridir¹⁻⁶. Uygulaması zahmetli ve zaman alıcı olduğundan, bu yöntem rutin laboratuvarlardan ziyade in vitro araştırmalarda tercih edilmektedir. Yöntemde, araştırılmak istenen farklı ilaçların, değişik konsantrasyonları 96 kuyucuklu plak üzerinde biraraya getirilerek kombinasyon etkinlikleri test edilmektedir⁷. İlaçların kombinasyondan elde edilen minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleriyle tek başlarına olan MİK değerleri oranlanarak, fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FK) elde edilir. Daha sonra kombinasyonda yer alan ilaçların FK değerleri toplanarak FK indeksi (FKI) hesaplanır. Bu yöntemde sinerji $FKI \leq 0.5$, aditif etkileşim $FKI = 1$ ve antagonizma $FKI = 2$ baz alınarak tanımlanır⁷⁻⁹. Daha yeni kaynaklar, 4'ten büyük bulunan FKI değerlerinin antagonizma olarak tanımlanması gerektiğini belirtmekte¹⁰, kesin sınırlarla tanımlanan sinerji ($FKI \leq 0.5$) ve antagonizma ($FKI > 4$) dışındaki durumlar için ($0.5 < FKI \leq 4$) tanımlanamayan (indiferansiye) teriminin kullanılmasının daha doğru olacağını bildirmektedir^{7,10-12}.

Dama tahtası testinin uygulanmasında tanımlanmış standart bir yöntem olmasına rağmen, elde edilen sonuçların yorumlanması ve değerlendirilmesinde, araştırmacılar tarafından farklı yöntemler kullanılmaktadır⁷. Son yıllarda özellikle yoğun bakımda yatan hastalarda gözlenen hastane enfeksiyonlarında sıklıkla etken olarak karşımıza çıkan ve çoğunlukla da çoklu ilaç direnci gösteren *Acinetobacter baumannii*, kombinasyon çalışmalarına en çok konu olan etkenler arasındadır. Bununla birlikte *A.baumannii* suşlarıyla dama tahtası yöntemi kullanılarak yapılmış çalışmalarda çeşitli antibiyotik kombinasyonları için farklı sinerjistik etkileşim oranları bildirilmektedir. Bu farklılıkların suşlara ait özelliklerden kaynaklanıyor olabileceği ileri sürülebilir. Ancak hemen hemen aynı özellikleri taşıyan bakterilerle aynı ilaç kombinasyonlarının dama tahtası yöntemiyle test edildiği farklı çalışmalarda da farklı düzeyde sinerji oranlarının bildiriliyor olması, sinerji oranlarının

daki farklılıkların bu çalışmaların bir çoğunda farklı yorumlama yöntemlerinin kullanılmasına bağlı olabilir^{1,2,5,13}. Bu çalışmada, *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde klinisyenlerce sıklıkla tercih edilen imipenem-ampisilin/sulbaktam (IPM/SAM) ve meropenem-ampisilin/sulbaktam (MEM/SAM) kombinasyonlarının karbapenem direnci yanında çoklu ilaç direnci gösteren *A.baumannii* izolatları üzerindeki etkinliği in vitro olarak dama tahtası sinerji yöntemiyle test edilip, testlerin sonuçları araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilen dört farklı yorumlama yöntemi kullanılarak ayrı ayrı belirlenmiştir. Böylece değerlendirme yöntemlerindeki farklılıkların sinerjistik, tanımlanamayan ve antagonistik etkileşim oranlarını ne derecede etkilediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Şubat 2009-Şubat 2011 tarihleri arasında hastanemiz yoğun bakım üniterlerinde tedavi gören farklı hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen, BD BBL Crystal E/NF yarı otomatize sistemiyle *A.baumannii* olarak tanımlanan ve CLSI kriterleri dikkate alınarak antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile test edilerek çoklu ilaç direnci gösterdikleri tespit edilen 34 *A.baumannii* suşu alındı. Karbapenemlere ek olarak sefalosporinler, aminoglikozidler, antipsödomonal penisilinler, kinolonlar, ampisilin/sulbaktam ve/veya tetrasiklin grubu antibiyotik sınıflarından en az üç tanesinin kabul görmüş tipik antibiyotiklerine dirençli olan izolatlar çoklu ilaç dirençli *A.baumannii* olarak tanımlandı.

Çalışmada; *imipenem monohydrate powder* (Sigma-Aldrich), *meropenem trihydrate powder* (Sigma-Aldrich), *ampicillin sodium salt powder* (Sigma-Aldrich) ve *sulbactam sodium powder* (Zhejiang Xinhua Pharmaceutical Co) antibiyotiklerinin toz şekilleri CLSI'nin önerilerine göre stok solüsyonları ve sulandırılmaları hazırlanarak kullanıldı^{14,15}. Öncelikle imipenem (IPM), meropenem (MEM) ve ampisilin/sulbaktam (SAM) için MİK değerleri, katyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyeri (BD BBL Mueller Hinton II Broth) kullanılarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Bu MİK değerlerinin iki kat üstü dilüsyon (4 x MİK) ve beş kat altı dilüsyon (0.03 x MİK) kullanılarak iki farklı ilaç kombinasyonunun etkinliği, her bir izolat için 96 kuyucuklu plak üzerinde test edildi. Plak üzerinde her iki ilacın MİK değerleri dama tahtası testi ile eş zamanlı olarak tekrar çalışıldı; elde edilen sonuçlar, ilk çalışılan MİK değerleri ile karşılaştırıldı ve sinerji testleri yorumlanırken eş zamanlı olarak çalışılan MİK değerleri kullanıldı. Çalışmada kullanılan bir kombinasyonun dama tahtası plağının temsili görünümü Şekil 1'de sunuldu. Plak üzerinde antibiyotik içermeyen pozitif kontrol kuyucuğu ve bakteri içermeyen negatif kontrol kuyucuğu hazırlandı; kalite kontrol suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı. Test edilen iki ilacın farklı konsantrasyonları ve son bakteri inokulum konsantrasyonu 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde bakteri süspansiyonu kuyucuklara pipetlendi; $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 20 saatlik inkübasyondan sonra plaklar gözle değerlendirildi. Kullanılan bakteri inokulumunun son konsantrasyonunun 5×10^5 CFU/ml olduğundan emin olmak için, inokulum süspansiyonlarının koloni sayımını yapmak amacıyla, pipetaj bitiminde CLSI önerilerine göre¹⁴, üreme kontrol kuyucuğundan 0.01 ml alınarak, 10 ml steril fizyolojik tuzlu suda sulandırıldı (1/1000 dilüsyon). Karıştırılıp homojenize edildikten sonra, bu sulandırmadan 0.1 ml'lik hacim koyun kanlı agar

											IPM MİK*	SAM MİK**	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	IPM 128 SAM 1	IPM 128 SAM 2	IPM 128 SAM 4	IPM 128 SAM 8	IPM 128 SAM 16	IPM 128 SAM 32	IPM 128 SAM 64	IPM 128 SAM 128		IPM 128	SAM 128	ÜK	
B	IPM 64 SAM 1	IPM 64 SAM 2	IPM 64 SAM 4	IPM 64 SAM 8	IPM 64 SAM 16	IPM 64 SAM 32	IPM 64 SAM 64	IPM 64 SAM 128		IPM 64	SAM 64		
C	IPM 32 SAM 1	IPM 32 SAM 2	IPM 32 SAM 4	IPM 32 SAM 8	IPM 32 SAM 16	IPM 32 SAM 32	IPM 32 SAM 64	IPM 32 SAM 128		IPM 32	SAM 32		
D	IPM 16 SAM 1	IPM 16 SAM 2	IPM 16 SAM 4	IPM 16 SAM 8	IPM 16 SAM 16	IPM 16 SAM 32	IPM 16 SAM 64	IPM 16 SAM 128		IPM 16	SAM 16		
E	IPM 8 SAM 1	IPM 8 SAM 2	IPM 8 SAM 4	IPM 8 SAM 8	IPM 8 SAM 16	IPM 8 SAM 32	IPM 8 SAM 64	IPM 8 SAM 128		IPM 8	SAM 8		
F	IPM 4 SAM 1	IPM 4 SAM 2	IPM 4 SAM 4	IPM 4 SAM 8	IPM 4 SAM 16	IPM 4 SAM 32	IPM 4 SAM 64	IPM 4 SAM 128		IPM 4	SAM 4		
G	IPM 2 SAM 1	IPM 2 SAM 2	IPM 2 SAM 4	IPM 2 SAM 8	IPM 2 SAM 16	IPM 2 SAM 32	IPM 2 SAM 64	IPM 2 SAM 128		IPM 2	SAM 2		
H	IPM 1 SAM 1	IPM 1 SAM 2	IPM 1 SAM 4	IPM 1 SAM 8	IPM 1 SAM 16	IPM 1 SAM 32	IPM 1 SAM 64	IPM 1 SAM 128		IPM 1	SAM 1	BYK	

* Eş zamanlı çalışılan IPM MİK.

** Eş zamanlı çalışılan SAM MİK.

ÜK: Üreme kontrolü; BYK: Besiyeri kontrolü.

Şekil 1. İmipenem (IPM) ve ampisilin/sulbaktam (SAM) için MİK değerlerinin 32 µg/ml tespit edildiği IPM/SAM kombinasyonunun dama tahtası plağındaki çalışma formatı (sayılar, µg/ml olarak antibiyotik konsantrasyonlarını göstermektedir).

besiyerine ekilerek, besiyerinin tüm alanına homojen bir şekilde yayıldı. $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyonun sonunda ortalama 50 koloninin varlığı hedeflendi (50 koloni = 5×10^5 CFU/ml). Dama tahtası testleri iki kez tekrarlanarak çalışıldı; uyumsuz çıkan sonuçlar iki kez daha çalışılarak, üreme olmayan kuyucuklardan %5 koyun kanlı besiyerine ekimler yapılarak inkübe edildi; üreme olmadığı netleştirilerek kontrolleri yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesi, aşağıda tanımlanan dört farklı yöntemle yapıldı¹⁶:

Yöntem 1: Bu yöntem, kombinasyondaki en düşük FİKİ'nin kullanılması esasına dayanır¹⁷. Bu yöntemde kombinasyon plağındaki üreme olmayan tüm kuyucuklar taranarak, en düşük FİKİ'nin hesaplandığı kuyucuk değerlendirmeye alınır ve o kuyucuktaki en düşük FİKİ değeri kullanılır.

Yöntem 2: Ortalama FİKİ'nin esas alındığı yöntemdir^{18,19}. Bu yöntemde, tüm satır ve sütunlardaki üreme olmayan en düşük ilaç konsantrasyonunun olduğu kuyucuklar değerlendirilmeye alınır. Bu kuyucukların her biri için A ve B ilacının FİK'leri hesaplanır ve her kuyucuk için ayrı ayrı FİKİ hesaplanarak, elde edilen değerler toplanır ve kuyucuk sayısına bölünerek FİKİ'nin ortalaması alınır.

Yöntem 3: Bu yöntemde tüm satır ve sütunlar taranarak, tüm satır boyunca ve tüm sütun boyunca üreme olmayan satır ve sütun değerlendirmeye alınır. Buralardaki kuyucukların FİKİ'leri toplanarak ortalamaları hesaplanır²⁰.

Yöntem 4: FİKİ hesaplaması yoktur. Kombinasyon plağındaki iki kuyucuk değerlendirmeye alınır. Kuyucuklardan bir tanesi her iki ilaç için de FİK'in 0.25 olduğu ortak kuyucuk, diğeri her iki ilaç için de FİK'in 2 olduğu ortak kuyucuktur. FİK 0.25 olan keşişim kuyucuğunda üreme yoksa sinerjistik etkileşim, FİK 2 olan keşişim kuyucuğunda üreme varsa antagonistik etkileşim olarak değerlendirilir. Diğer tüm durumlar tanımlanamayan etkileşim olarak sınıflandırılır²¹.

Bahsedilen bu yöntemler ile ilgili olarak; çalışılan bakterinin her bir antibakteriyel ilaç için elde edilen MİK değerleri baz alınarak, bu değerlerin iki kat üstü dilüsyon (FİK değeri 4 çıkan) ve beş kat altı dilüsyon (FİK değeri 0.03 çıkan) değerlerini gösteren açıklama Şekil 2'de gösterildi. Bu şekilde her bir yöntem için değerlendirmeye alınan kuyucuklar o yöntemin numarası ile belirtildi. Çalışmamızda, $FİKİ \leq 0.5$ sinerjistik etkileşim, $FİKİ > 4$ antagonistik etkileşim ve $0.5 < FİKİ \leq 4$ tanımlanamayan etkileşim olarak değerlendirildi.

Çalışmada kullanılan her iki kombinasyon için dört yorumlama yöntemi ile sinerjistik, antagonistik ve tanımlanamayan etkileşimler arasındaki farklılıklar ki-kare analizi ile test edildi; $p \leq 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan izolatların tamamının IPM, MEM ve SAM için tek başına MİK değerleri dirençli aralıkta test edilmiştir (Tablo I). Her üç ilaç için de MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 32 µg/ml ve 64 µg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo II'de her iki kombinasyon için dört farklı değerlendirme yöntemiyle elde edilen sinerji testi sonuçları görülmektedir. Yöntemler arasında her iki ilaç kombinasyonu için de sinerjistik ve tanımlanamayan etkileşimi tespit etme oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.0001$). Her iki kombinasyon için de sinerjiyi en yüksek oranda tespit eden yöntem, Yöntem 1 (%94-88) olup, bunu sırasıyla Yöntem 4 (%91-88) ve Yöntem 2 (%50-47) izlemiştir. Sinerjiyi en düşük oranda tespit eden ise Yöntem 3 (%9-3)'tür. IPM/SAM kombinasyonunda Yöntem 3 ile sadece bir izolatta antagonizma gözlenmiştir. Test edilen yöntemlerle antagonizmanın tespit edilmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).

A ilacı xMİK		1	2	3	4	5	6	7	8
A	4.00					3			
B	2.00					3		4	
C	1.00	2, 3	3	3	3	3	3	3	3
D	0.50	■	2			3			
E	0.25	■	■	2	4	3			
F	0.13	■	■	■	2	3			
G	0.06	■	■	■	1, 2	3			
H	0.03	■	■	■	■	2, 3			
B ilacı xMİK		→ 0.03	0.06	0.13	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00

Şekil 2. Dört farklı yorumlama yönteminin temsili plak üzerinde gösterilmesi (■ Üreme olan kuyucuklar; □ Üreme olmayan kuyucuklar).

TARTIŞMA

Çalışmamızda, dama tahtası yöntemiyle elde edilen sinerji oranının, testin değerlendirilme yöntemine bağlı olarak büyük oranda değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Çoklu ilaç direnci (ÇİD) gösteren *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ajanların etkinliğini artırmak amacıyla kombine antibiyotik kullanımı önerilmektedir²². Ampisilin/sulbaktam veya tek başına sulbaktamın karbapenemlerle kombinasyonunun, ÇİD *A.baumannii* türlerine karşı beta-laktamların aktivitesini geliştirdiğini ortaya koyan çeşitli çalışmalarda bildirilen sinerjistik etkileşim oranları geniş bir aralıkta yer almaktadır^{4,23-25}. Dama tahtası sinerji testini kullanarak yapılan bir çalışmada Kiffer ve arkadaşları² 48 ÇİD *A.baumannii* izolatının, meropenem ve sulbaktam kombinasyonu için %29.2'sinde sinerjistik etkileşim saptamışlardır. Pongpech ve arkadaşları⁵ tamamı imipenem ve meropeneme dirençli, 30 ÇİD *A.baumannii* izolatında, aynı yöntemle meropenem ve sulbaktam kombinasyonunda %70 sinerjizm tespit etmişler, Sheng ve arkadaşları²⁶ ise yine karbapeneme dirençli *A.baumannii* izolatlarında dama tahtası yöntemi ile imipenem ve ampisilin/sulbaktam kombinasyonunda %16 oranında sinerji bildirmişlerdir. Bu ve benzeri birçok çalışmadan bildirilen farklı sinerji oranlarına rağmen makalelerin detaylı incelen-

Tablo I. Test Edilen Antimikrobiyallerin Örneklere Göre MK Değerleri

Örnek no	Örnek tipi	İmipenem (µg/ml)	Meropenem (µg/ml)	Ampisilin-sulbaktam (µg/ml)
1	Kan	16	64	64
2	Kan	16	64	64
3	Trakeal aspirat	32	32	64
4	Kan	16	16	32
5	Trakeal aspirat	16	16	64
6	Trakeal aspirat	16	16	64
7	Kan	32	16	64
8	Kan	16	16	32
9	Trakeal aspirat	32	16	32
10	Trakeal aspirat	16	16	32
11	Trakeal aspirat	64	16	64
12	Kan	32	32	32
13	Kan	16	16	32
14	Kan	32	32	128
15	Kan	32	16	32
16	Kan	32	16	64
17	Trakeal aspirat	16	32	32
18	Kan	16	64	32
19	Kan	32	64	64
20	Kan	32	32	32
21	Trakeal aspirat	16	16	32
22	Trakeal aspirat	32	64	64
23	Kan	32	64	32
24	Trakeal aspirat	64	64	128
25	Trakeal aspirat	64	128	32
26	Trakeal aspirat	16	32	32
27	Kan	32	64	64
28	Trakeal aspirat	32	64	64
29	Yara	32	64	64
30	Trakeal aspirat	32	64	32
31	Kan	32	64	32
32	Trakeal aspirat	32	64	64
33	Trakeal aspirat	16	16	32
34	Trakeal aspirat	64	128	64

MIK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

Tablo II. Dama Tahtası Testinden Dört Farklı Yorumlama Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlar

	Yöntem 1 Sayı (%)	Yöntem 2 Sayı (%)	Yöntem 3 Sayı (%)	Yöntem 4 Sayı (%)
IPM/SAM (n= 34)				
Sinerji	30 (88)	17 (50)	3 (9)	30 (88)
Tanımlanamayan	4 (12)	17 (50)	30 (88)	4 (12)
Antagonizma	-	-	1 (3)	-
MEM/SAM (n= 34)				
Sinerji	32 (94)	16 (47)	1 (3)	31 (91)
Tanımlanamayan	2 (6)	18 (53)	33 (97)	3 (9)
Antagonizma	-	-	-	-

IPM: İmipenem; SAM: Ampisilin/sulbaktam; MEM: Meropenem.

mesi göstermektedir ki, bu çalışmalarda dama tahtası testi standart bir uygulama yöntemi ile yapılıyor olsa da, FİK değerleri belirlenirken seçilen kuyucuk ve FİKİ hesaplandık-tan sonra etkileşim türünü belirlemek için kullanılan sınır değerler genelde çalışmalar arasında farklılık vardır. Bir kısım çalışmada ise araştırmacılar testi hangi yöntemle yorumladığını net olarak açıklamamaktadır. Örneğin Kiffer ve arkadaşlarının² çalışması incelendiğinde; araştırmacıların FİK değerlerini belirlerken Yöntem 2'yi kullandıkları ve kombinasyonda yer alan ilaçlar için $FİKİ \leq 0.5$ ise sinerji; $0.5 > FİKİ < 1$ ise parsiyel sinerji; $FİKİ = 1$ ise aditif; $1 > FİKİ < 4$ ise tanımlanamayan ve ≥ 4 ise antagonizma olarak değerlendirdikleri görülmektedir. Diğer taraftan Pongpech ve arkadaşları⁵ ile Sheng ve arkadaşları²⁶, FİK değerlerini belirlerken benzer şekilde Yöntem 3'ü kullandıkları halde, etkileşim türünü belirlerken ilk araştırmacı grubu⁵ $FİKİ < 1$ ise sinerji; $FİKİ = 1$ ise aditif; $FİKİ > 1$ ise antagonistik; ikinci araştırmacı grubu²⁶ ise $FİKİ \leq 0.5$ ise sinerji; $0.5 > FİKİ \leq 4$ ise tanımlanamayan, $FİKİ > 4$ ise antagonistik etkileşim şeklinde yorumlamışlardır. Yorumlamada esas alınan sınır değerlerindeki farklılık dikkate alındığında Pongpech ve arkadaşlarının⁵ daha yüksek olarak bildirdikleri sinerji oranının $0.5 > FİKİ < 1$ aralığındaki değerlerin tespit edildiği izolatlar için de sinerji yorumu yapılmış olmasından kaynaklandığı görülmektedir. Sinerji tanımlaması yapılırken $FİKİ \leq 0.5$ tanımlaması kullanılsa bile, FİKİ hesaplanırken kullanılan üreme olmayan kuyucuğun seçimi test sonuçlarını büyük oranda değiştirmektedir. Nitekim, bu çalışmalarda bildirilen geniş aralıktaki oranlar gibi, bizim çalışmamızda da, MEM/SAM ve IPM/SAM kombinasyonlarında, test edilen tüm yorumlama yöntemleri için $FİKİ \leq 0.5$ ise sinerji ve $FİKİ > 4$ ise antagonizma tanımlamaları kullanılmasına rağmen, kuyucuk seçiminde kullanılan dört farklı yorumlama yöntemiyle oldukça farklı sinerji oranları elde edilmiştir.

Ülkemizden bildirilen sinerji çalışmaları incelendiğinde, araştırmacıların büyük çoğunluğunun uygulaması kolay ve zahmetsiz bir yöntem olması nedeniyle, sinerji çalışmalarında E-test yöntemini tercih ettikleri görülmektedir. Dama tahtası yöntemi kullanılarak yapılan sınırlı sayıda çalışmada ise, araştırmacılar sinerji tanımlaması için kullandıkları sınır değerlerini bildirseler de, dama tahtası plağını yorumlarken hangi yöntemi kullandıklarını

net olarak açıklamamaktadırlar^{27,28}. Oysa kullanılan yöntemler dışında, test edilen izolatlara bağlı olarak da sinerjistik aktivite oranlarının değişiklik gösterebileceği unutulmamalıdır. İzolatın, test edilen antimikrobiyal ajana yüksek direnç veya duyarlılık göstermesi, sinerjistik aktiviteyi değiştirebilmektedir. Bu nedenle, kombinasyon tedavisi uygulanacaksa, daha önceden yapmış in vitro çalışmalar ışığında etkili olabilecek kombinasyonlar ampirik olarak tercih edilebilirse de, hastada etken olan izolatın kullanılan kombinasyona duyarlılığının sinerji testleri ile belirlenmesinin, tedavinin doğru yönlendirilmesinde gerekli olduğu göz ardı edilmemelidir. Dama tahtası yöntemi ile yapılmış araştırmaları okurken ve yorumlarken, okuyucu tarafından bu farklılıkların bilinmesi ve göz önünde bulundurulması önemlidir. Testin standart bir uygulama yönteminin olmasına rağmen, yorumlama yöntemlerindeki farklılıklar nedeniyle, bu test standart sonuçların elde edilmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle testin yorumlama yönteminin, tıpkı uygulama yönteminde olduğu gibi standardize edilmesi gerekmektedir. Bunun için, en uygun yorumlama metodunu belirlemek adına, "time-kill" yöntemi gibi diğer standart kombinasyon testlerinden elde edilen uyumlu sonuçların karşılaştırıldığı ve ayrıca sinerjistik etkileşim gözlenen kombinasyonlardan elde edilen klinik yararların araştırıldığı ileri çalışmalara gereksinim vardır. Bununla birlikte, ÇİD gösteren *A.baumannii* kaynaklı enfeksiyonu bulunan hastaların aynı anda birçok antimikrobiyal ajan kullandığı düşünülürse, bu hastaların tedavi rejimlerini oluştururken elimizdeki bulguların dikkate alınması, hastaların en azından potansiyel olarak antagonizma oluşturacak kombinasyonları kullanmasını önleyecektir²⁹.

KAYNAKLAR

1. Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(3): 753-7.
2. Kiffer CR, Sampaio JL, Sinto S, et al. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52(4): 317-22.
3. Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. In vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009; 8: 18.
4. Sader HS, Jones RN. Comprehensive in vitro evaluation of cefepime combined with aztreonam or ampicillin/sulbactam against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25(5): 380-4.
5. Pongpech P, Amornnoppattanakul S, Panapakdee S, et al. Antibacterial activity of carbapenem-based combinations against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Med Assoc Thai* 2010; 93(2): 161-71.
6. Yu VL, Felegie TP, Yee RB, Pasculle AW, Taylor FH. Synergistic interaction in vitro with use of three antibiotics simultaneously against *Pseudomonas maltophilia*. *J Infect Dis* 1980; 142(4): 602-7.
7. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations, pp: 365-440. In: Lorian V (ed), *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 2005, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
8. Sabath LD. Synergy of antibacterial substances by apparently known mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 1967; 7: 210-7.
9. Garrod LP, Waterworth PM. Methods of testing combined antibiotic bactericidal action and the significance of the results. *J Clin Pathol* 1962; 15: 328-38.
10. Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57(3): 573-6.

11. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(3): 693-715
12. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(1): 1.
13. Hogg GM, Barr JG, Webb CH. In-vitro activity of the combination of colistin and rifampicin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41(4): 494-5.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 7th ed. Document M7-A7, 2006. CLSI, Wayne, PA.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement. Document M100-S20, 2010. CLSI, Wayne, PA.
16. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44(4): 363-6.
17. Moody J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods, pp: 5.12.1-5.12.23. In: Isenberg HD (ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2007, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
18. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with E-test, time-kill and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38(1): 43-50.
19. den Hollander JG, Mouton JW, Verbrugh HA. Use of pharmacodynamic parameters to predict efficacy of combination therapy by using fractional inhibitory concentration kinetics. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(4): 744-8.
20. Eliopoulos GM. Synergism and antagonism. *Infect Dis Clin North Am* 1989; 3(3): 399-406.
21. Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations, pp: 330-96. In: Lorian V (ed), *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 1996, 4th ed. Williams & Wilkins Co, Baltimore.
22. Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PB, Waites KB. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(5): 881-5.
23. Ko WC, Lee HC, Chiang SR, et al. In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53(2): 393-5.
24. Wang FD, Lin ML, Lee WS, Liu CY. In vitro activities of beta-lactam antibiotics alone and in combination with sulbactam against gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23(6): 590-5.
25. Tripodi MF, Durante-Mangoni E, Fortunato R, Utili R, Zarrilli R. Comparative activities of colistin, rifampicin, imipenem and sulbactam/ampicillin alone or in combination against epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30(6): 537-40.
26. Sheng WH, Wang JT, Li SY, et al. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities and synergistic activities of antimicrobial combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter* species: *Acinetobacter baumannii* versus *Acinetobacter* genospecies 3 and 13TU. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70(3): 380-6.
27. Çoban AY, Bilgin K, Uzun M, Durupınar B. Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* klinik izolatlarına karşı linezolidin izoniazid ve rifampisin ile kombine etkisi. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(2): 293-7.
28. Yalçın B, Kalkancı A, Gürelif F, Fidan I, Kuştimur S, Özdek Ş. Moksifloksasin ve amfoterisin B kombinasyonunun *Candida* türleri üzerine in vitro sinerjistik etkisi. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(1): 65-70.
29. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2010, 35(3): 219-26.