

# Antimikrobiyal Aktivite Araştırma Yöntemleri

Ufuk ABBASOĞLU\*

## Antimikrobiyal Aktivite Araştırma Yöntemleri

**Özet :** Maddelerin antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için birçok *in vitro* yöntem geliştirilmiştir. Sonuçların doğru değerlendirilmesi için, çalışmanın amacına ve maddenin karakterine göre uygun yöntem seçilmelidir. Bu çalışmada, *in vitro* antimikrobiyal aktivite tayin yöntemleri derlenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

**Anahtar kelimeler :** Antimikrobiyal aktivite

G.T. : 1.5.1995

K.T. : 15.5.1996

## The Antimicrobial

### Activity Research Methods

**Summary :** Various *in vitro* methods have been developed for the determination of antimicrobial activity of compounds. For the exact evaluation of the results, convenient methodology has to be selected according to the characteristics of the compound as well as purpose of the study. In this paper, *in vitro* methods used for the determination of antimicrobial activity are compiled and results are evaluated.

**Keywords :** Antimicrobial activity

## Giriş

Enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçların sayısında ve yapılarında sürekli artış görülmektedir. Araştırmacılar, insana en az zararlı, geniş bir mikroorganizma cinsine en küçük dozla etki edecek yeni maddeler üzerinde çalışmaktadırlar. Belli bir moleküle bağlı kalarak sentezlenen veya bitkilerden izole edilen yeni maddelerin spesifik kullanım amaçlarını belirlemek için fiziksel, kimyasal, biyolojik, farmakolojik, teknolojik çalışmalar sürdürülmektedir. Öncelikli çalışmalardan biri *in vitro* biyolojik aktivite araştırmalarıdır. Maddelerin antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek için antiviral, antifungal, antibakteriyel aktivite araştırmaları yapılmaktadır. Virus, fungus ve bakterilerin üremelerini durduran veya inaktive eden madde konsantrasyonları belirlendikten sonra daha ileri çalışmalara devam edilmektedir.

Diğer yandan; dirençli mikroorganizmaların oluşmasına veya hastayla ilgili faktörlere dayanan antimikrobiyal ilaç kullanımında en etkili sonuca varmak için, klinik izolatlar üzerinde antimikrobiyal ilaçların etkinliklerini belirlemek rutin hale gelmiştir.

Amaç ne olursa olsun maddelerin antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek için çeşitli *in vitro* yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle, maddenin antimikrobiyal aktiviteye sahip olup olmadığı, aktivitesi varsa Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve mikroorganizma spektrumu belirlenir. *In vitro* antimikrobiyal aktivite testleri içinde amaca en uygununu seçmek gerekir. Yöntemin seçiminde; maddelerin sayısı, miktarı, çözünürlüğü ayrıca kullanılacak mikroorganizma cinsi, özelliği ve yoğunluğu rol oynar. Sonuçların güvenilir ve tekrarlanabilir olmasına ilaveten en az emekle, en kısa sürede, en ekonomik olan yöntem tercih edilmelidir.

\* Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Ankara.

### Antiviral Aktivite Araştırmaları

Yöntemlerin esasını, virusun ürettiği ortamda üremesi ile, maddeyle karşılaştırılınca aynı ortamda üremesinde oluşan değişikliği belirlemek oluşturur<sup>1</sup>. Antiviral maddelerin aktivitesini değerlendirmek için çok özel ekip ve ekipmana gerek vardır. Viruslar yalnızca canlı hücrelerde üreyebildiklerinden bunlarla ilgili çalışmalar doku kültürleri, embriyolu yumurta ve deney hayvanlarında yürütülmektedir. Bunlar arasında, birçok avantajı nedeniyle doku kültürü teknikleri en çok kullanılanlardır.

Antiviral maddenin aktivitesinin ölçülmesi, virusun hücrelere verdiği zararın önlenmesinin ölçülmesine dayanır. Virusun zarara uğraması ise doku kültürünü harabeden yeteneğinin ortadan kalktığının belirlenmesi yani Cyto Pathogen Effect (CPE)in azalmasının belirlenmesidir. Fakat virusların hepsi, üreten CPE oluşturmaz. Bu durumda virusların hemagglütinasyon yeteneğinin ölçülmesi teknikleri gündeme gelir. Esası bilinen bu teknikler, zamanla modifiye edilerek en güvenilir ve kolay uygulanabilen şekle dönüştürülmüştür.

**DU (Dye Uptake) Yöntemi:** Viral CPE inhibisyonunu ölçme esasına dayanır. İnterferon aktivitesini ölçme tekniğinin adaptasyonu ile geliştirilmiştir. Teknik, canlı hücrelerin nötral red gibi bir boyayı alabilme özelliğine dayanır. Boyayı alma kolorimetrik yolla ölçülür. Viral CPE nin %50 sini inhibe eden madde konsantrasyonu, %50 inhibisyon dozu olarak kabul edilir. Bu teknik, viroloji laboratuvarlarında tanıda kullanılan çok uygun, güvenilir, tekrar edilebilir bulunmuştur.

**PR (Plaque Reduction) Yöntemi:** Viral CPE inhibisyonunu ölçme esasına dayanır. Bütün sitopatik virusların maddeye duyarlılıklarını belirlemek için ve viral plak oluşumunun inhibisyonuna dayanan standart bir tekniktir. 72 saatlik inkubasyondan sonra kristal viole ile boyanan hücreler arasında boyanmayan boşluklar sayılır. Maddesiz kontrol virus %si, çeşitli dilüsyonlardaki maddenin oluşturduğu plak % sinin saptanmasıyla, doz-yanıt eğrisi oluşturularak infeksiyöz doz 50 hesaplanır. Bu teknik çok basittir fakat otomatik hale getirmek zordur. Plakları saymak sıkıcı ve zaman alıcıdır. Her madde di-

lüsyonunun paralel çalışıldığı düşünülürse çok sayıda pleyte, besiyerine, hücreye gerek vardır. Çok sayıda virusla çalışmak gerektiğinde PR tekniği fazla pratik ve ekonomik görünmemektedir.

Ayrıca viral protein üretimindeki düşüşün ölçülmesine dayanan ELISA ve viral DNA sentezindeki azalmayı ölçen DNA hibridizasyon tekniğiyle de virus inaktivasyonu ölçülür.

Yurdumuzda yapılan çalışmalarda çeşitli bitkilerden elde edilen ham saponozitlerin Polio virus Tip 1, Herpes Simplex Virus Tip 1 ve Tip 2, Vesicular Stomatitis Virus, Influenza A ve Parainfluenza Tip 1 üzerine etkileri viral enfeksiyözitenin düşmesi ve hemagglütinasyon inhibisyon teknikleriyle araştırılmış, virusların Doku Kültürü İnfektif Doz<sub>50</sub> (DKID<sub>50</sub>) leri önce ve maddeyle temasdan sonra ölçülerek virusların aktivitelerindeki düşme bildirilmiştir<sup>2</sup>.

Ersan<sup>3</sup>, ise dökülen hücreleri sayarak, aktiviteyi % CPE olarak belirlemiştir. Virusun infeksiyözitesi ölçülüp, maddeyle temasdan sonra düşmesine dayanan diğer bir çalışmada, 14 madde referans madde etkisiyle kıyaslanarak sonuçlar belirlenmiştir<sup>4</sup>.

### Antifungal Aktivite Araştırmaları

Klinik laboratuvarlar, antifungal ajan seçiminde standart testler üzerinde çalışmalarını sürdürmektedir. Antifungal ajanlarla in vivo etkinin, duyarlılık testleriyle uygunluğunun çok az görülmekte olduğu bildirilmektedir<sup>5</sup>. Flukonazol ve Candida albicans şuşları ile yapılan in vitro bir çalışmada MİK değerinin 0.5-128 µg/ml gibi çok büyük bir aralıkta olduğu yayınlanmıştır<sup>6</sup>.

Bazı faktörler in vitro antifungal aktivite testlerinin standardizasyonunun güçlüklerine neden olmaktadır. Yavaş üreyen fungus türleri, besiyeri ile ilgili formülasyon, pH, miktar gibi etkenler yanında inkubasyon süresi ve sıcaklığı farklılıklar doğurmaktadır.

Antifungal ve antibakteriyel aktivite yöntemleri teknik olarak aynıdır. Yalnızca kullanılan besiyerleri, inkubasyon koşulları farklılık gösterir. Genel olarak yöntemler;

- 1) Dilüsyon yöntemi  
Buyyon dilüsyon  
Makrodilüsyon  
Mikrodilüsyon  
Agar dilüsyon

- 2) Difüzyon yöntemi olarak şematize edilebilir.

Günümüzde kullanımda olan; polien makrolitler, azoller, glukan sentetaz inhibitörleri, DNA ve RNA sentez inhibitörleri sınıfından 10 kadar antifungal ajan vardır. Herbiri için farklı çözücü, besiyeri veya mikroorganizma suşu önerilmektedir. NCCLS alt komitesi, maya ve küfler için uygulanan testlerle ilgili sorunlara çeşitli çözümler getirmektedir.

#### Buyyon dilüsyon yöntemi

L-glutaminli sentetik besiyerleri önerilmektedir. Besiyerleri filtrasyonla sterilize edilip, +4°C de saklanır. Bu tip besiyerleri *Candida* türleri için uygunken *Cryptococcus neoformansa* uygun değildir. Aktivitesi denenecek maddelerin stok solusyonlarını hazırlamak için distile su, DMSO, DMF, polietilen glikol, HCl çözeltisi gibi farklı çözücüler kullanılabilir.

**İnokulum hazırlanması.** Maya ve bakteri inokulumları MacFarland 0.5 yoğunluğunda hazırlanır. Bu yoğunluğu sağlamak için; Sabouroud Dextrose Agarda,(maya için) 48 saat üremiş mayadan 1mm çaplı koloni alınıp, 5 ml % 0.85 lik steril NaCl içinde süspanse edilir. Bu yoğunluktaki süspansiyonda yaklaşık  $1-5 \times 10^6$  CFU/ml vardır. Macfarland 0.5 yoğunluğunun kontrolü spektrofotometrede 530 nm dalga boyundaki bulanıklıkla veya 0.5 ml %1.175 w/v  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  üzerine 99.5 ml % 1 lik  $H_2SO_4$  eklenince oluşan bulanıklıkla kıyaslanarak yapılabilir. İnokulum hazırlanırken  $10^6$  lik süspansiyon 1/100 oranında dilüe edilerek  $1-5 \times 10^4$  CFU/ml konsantrasyonda hazırlanır. Ayrıca pratik olarak 37°C deki 2-8 saatlik kültürün yoğunluğunun MacFarland 0.5'e eşdeğer olduğu ifade edilmektedir<sup>7</sup>.

Stok madde solusyonu, sıvı besiyeriyle çift katlı dilüsyondan sonra üzerlerine standardize edilmiş mikroorganizma süspansiyonu eklenir. Test paralel olarak 12 tüpte uygulanır.

İnkubasyon 35°C de 24-48 saat önerilmektedir. Süre sonunda tüplerdeki bulanıklık oranına göre 0, 1+, 2+,

3+, 4+ olarak değerlendirilir. Testde çözücü, mikroorganizma ve besiyeri kontrolleri mutlaka yapılmalıdır.

#### Agar dilüsyon testi

*C.albicans* izolatlarında imidazollere dirençlilik bu yöntemle belirlenemezse de buyyon dilüsyon yöntemine iyi bir alternatiftir. Çözücüde hazırlanmış stok madde solusyonunun 10 seri tüpte, çift katlı dilüsyonu yapılır. 1/10 oranında, steril erimiş, 50°C ye soğutulmuş agarla birlikte petrilere dökülür. Donması beklenen petri yüzeylerine  $1-3 \times 10^2$  CFU inokulasyonlar yapıldıktan sonra 30°C de inkubasyon önerilmektedir.

#### Difüzyon yöntemi

Bu yöntem henüz standardize edilmemiştir. Fakat British Society for Mycopathology, flusitozin için *C.albicans*'a disk difüzyon testini açıklamıştır.

#### Antibakteriyel Aktivite Araştırmaları

Antiviral ve antifungal aktivite testlerindeki gibi maddenin, üreyen mikroorganizmayı etkileyip üremesinin engellendiğinin belirlenmesi esasına dayanır<sup>7,8-12</sup>. Klinik Laboratuvar Standardları Ulusal Komitesi - National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>11</sup>, in vitro antimikrobiyal aktivite çalışmalarında belli koşullar getirmiştir. Araştırmacılar bu koşullara uymaktadır. Uygulama sırasında araştırmacıların karşılaştıkları problemleri alt komiteler çözümlenmeye çalışmaktadır. Çalışmalar; yeni antimikrobiyal maddelerin aktiviteleri, dayanıklılığı ve etkinliği üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Etkinlik çalışmalarında madde olarak eczane stokları veya klinik preparatlar kullanılmamalıdır. Standart maddeler ilaç üreticilerinden sağlanmalıdır. Kullanım tarihleri belli olmalı, 20°C de veya altında, desikatör içinde korunmalıdır. Bazı antibiyotiklerin 24 saatte tortulandığı, bazılarının sulu solusyonlarda dayanıksız olduğu Wick<sup>13</sup> tarafından bildirilmektedir. Böyle maddelerle çalışırken uygun yöntemin bilinmesi gerekmektedir.

Antimikrobiyal maddelerin stok solusyonlarını hazırlamak için, fosfat tamponu (pH 6-8), dimetilsülfoksit, sodyum bikarbonat, sodyum hidroksit, hidroklorik asit ve metanol çözücü olarak önerilmektedir. Mad-

delerin dilüsyonları ise uygun pH daki tamponlarla yapılabileceği gibi distile su da kullanılmaktadır<sup>11</sup>.

**Dilüsyon teknikleri:** Sıvı ve katı besiyerinde dilüsyon teknikleri, bakterilere karşı antimikrobiyal maddenin in vitro aktivitesinin kantitatif ölçümüdür. Esas olarak, bir seri tüpe sıvı besiyeri veya petriye katı besiyeri konur. Antimikrobiyal madde çeşitli konsantrasyonlarda ilave edilir. Standardize edilmiş mikroorganizma süspansiyonu (MacFarland 0.5) inokule edilir. Bir gece, 35°C deki inkubasyondan sonra üremeyi engelleyen en düşük madde konsantrasyonu (MİK) belirlenir.

**Tüp dilüsyon yöntemi,** makro ve mikrodilüsyon olarak iki şekilde uygulanır. Her iki yöntemde de sıvı besiyeri olarak Müller-Hinton Buyyon kullanılır. Yöntemde esas, maddenin stok çözeltisinin hazırlanıp, sıvı besiyeriyle çift katlı dilüsyonlarının yapılmasıdır.

**Makrodilüsyon** yönteminde 13x100 lük steril test tüpleri kullanılır. Tüplerin ağzı genellikle pamukla kapalıdır. Maddelerin tüpte dilüsyonları yapılırken, her dilüsyon için ayrı pipet kullanılır.

**Mikrodilüsyon** yönteminde steril plastikten yapılmış, konik veya yuvarlak tabanlı, 96 kuyulu mikropleytlar kullanılır. Dilüsyon için çok kanallı transfer pipetleri kullanılır.

Makro ve mikrodilüsyon tekniğinde, 35°C de 16-20 saat inkubasyon önerilmektedir.

Mikroorganizmaların liyofilize şekli çözülerek kullanılmaktadır. Aksi halde -20°, -60°C veya sıvı nitrojende referans suşlar korunmalıdır. Kısa sürede kullanılacak suşlar, Soybean Casein Digest agarda üretilip, 2°, 8°C de depolanmalıdır. İki haftada kültürler tazelenmeli, anormal bir durum görüldüğünde yeni bir stok açılmalıdır.

Yöntemler aerobik bakteriler için kullanılmalıdır. Anaerobik bakteriler için Buyyon disk yönteminde ise; diskler 5 ml'lik tüplere dağıtılır, % 0.0005 hemin, % 0.002 menadion ve % 5 yeast extract ilave edilmiş beyin-kalb infüzyonu ilave edilir. 18-24 saatlik kültürden 1 damla inokule edilir. 35°C de, oksijensiz or-

tamda inkubasyona bırakılır. Besiyeri olarak tiyoglikolat buyyon kullanıldığında aerobik koşullarda, 16-20 saat inkubasyon da bildirilmektedir<sup>12</sup>. Gürler ve ark.<sup>14</sup> bu yöntemle disk difüzyon yönteminde daha hızlı sonuç aldıklarını ifade etmişlerdir.

#### Agar dilüsyon tekniği:

Müller-Hinton Agar besiyeri önerilmektedir. Eritilmiş, 48°-50°C ye soğutulmuş agara çeşitli konsantrasyonlardaki antimikrobiyal maddeler ilave edilir. Besiyerinin kalınlığı 3-4 mm olmalıdır. Hemen kullanılmayacaksa, en fazla 5 gün saklanabilir. Kullanım öncesi oda sıcaklığında bekletilmelidir. Yüzeyi kuru olmalıdır. Genellikle 1 kısım 10 x antimikrobiyal madde ile karıştırılmış 9 kısım erimiş agar karışımı kullanılır.

**İnokulasyon:** 10<sup>4</sup> CFU luk inokulum 3 mm çaplı öze ile çizilerek veya pastör pipeti ile agar yüzeyine inokule edilir. Süspansiyonun besiyeri yüzeyine absorbe olması için, petriyer oda sıcaklığında bekletilir. Bir süre sonra petriyer ters çevrilerek 35°C de 16-20 saat inkube edilir.

**Petriyerin değerlendirilmesi:** Koyu renk bir zemin üzerinde koloniler makroskopik olarak değerlendirilir. Üremeyi tamamen engelleyen maddenin en düşük konsantrasyonu MİK olarak belirlenir.

#### Disk Difüzyon Yöntemi :

Difüzyon yönteminde esas, katı besiyerine inokule edilen mikroorganizmaların, besiyeri yüzeyine konan disklerden yayılmakta olan antimikrobiyal madde ile birlikte üremeleridir. Antimikrobiyal maddenin etkinliği, disklerin çevresinde oluşan üremenin engellendiği zonların ölçülmesiyle belirlenir. Sıvı besiyerlerinde mikroorganizmalarla antimikrobiyal maddeler doğrudan ilişkide bulduklarından dilüsyon yöntemlerinde sonuçlar daha duyarlıdır. Buna karşın disk difüzyon yöntemi uygulama kolaylığı bakımından dünyada en çok kullanılan yöntemdir.

Besiyeri olarak Müller-Hinton Agar önerilmektedir. Trimetoprim+sulfametaksazol ve sülfanamidler için besiyerine at kanı, metisilin için Ca, Mg tuzları, oksasilin için % 5 NaCl ilavesi gerekmektedir. Katı be-

siyeri yüzeyine uygun yoğunluktaki mikroorganizma süspansiyonundan yaygın ekim yapılır. İyi üreyen mikroorganizmaların 1/1000 lik, yavaş üreyenlerin 1/100 hatta 1/10 luk dilüsyonları kullanılır<sup>9</sup>.

Diskler piyasada bulunabildiği gibi laboratuvarlarda da hazırlanabilir. Whatman No 1 veya No 2 süzgeç kağıtlarından ortalama 6 mm çaplı diskler zımba ile hazırlanır. Disklerin ne kadar sıvı emdiği önce su ile doyurulup tartılarak hesaplanır. Antimikrobiyal madde solusyonunu ne kadar emdiği bilinen disklerin madde içeriği hesaplanabilir. Ticari disklerin kullanıldığı testlerde standart mikroorganizmalarla disklerin denetimi yapılmalıdır.

Test yapılırken, petrielerin arka yüzlerine disklerin yerleri işaretlenir. İnce uçlu bir pensele petri kenarından 15 mm ve birbirlerinden 25-30 mm uzaklıkta uygun diskler yerleştirilir. Bir gecelik 35°C lik inkubasyondan sonra disklerin etrafındaki önlenim zonları ölçülür. mm cinsinden alınan ölçümlerle standart değerler karşılaştırılarak mikroorganizmalar duyarlı, orta duyarlı, dirençli veya maddeler etkili, orta derecede etkili, etkisiz olarak değerlendirilir. Bu yöntemde kullanılan besiyeri ve petrideki kalınlığı, disklerin özelliği, inokule edilen mikroorganizma sayısı, inkubasyon sıcaklığı ve süresi zon çapına etki eder.

#### Otomatik yöntemler

Son yıllarda, özellikle Amerika'da enstrümental yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler çok hızlı sonuç vermeleri yanında laboratuvarlar arası standardize edilebilmektedir. Pfizer tarafından 1970 lerin başlarında The Autobac Sistem geliştirilmiştir. Bakterilerin çabuk, kalitatif duyarlılıklarını ölçen üstün bir testdir. Abbott MS-2, Vitek, Sensititre florogenik-substrat, AutoSCAN Walk/Away, API ALADIN Sistemleri 3-8 saat içinde klinik örneklerin antimikrobiyal maddelere duyarlılıklarını otomatik olarak belirleyip, yazılı olarak veren ileri teknolojik sistemlerdir<sup>15</sup>.

Yapılan çalışmalar tarandığında bütün yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir. Makrodilüsyon tekniğini antifungal ve antibakteriyel aktivite çalışmalarında özellikle yurdumuzda, birçok araştırmacı denemiştir<sup>16-40</sup>. Çalışmaların bazılarında referans maddenin kont-

rol olarak kullanıldığı<sup>16-30</sup>, bazılarında kullanılmadığı<sup>31-34</sup> görülmektedir. Bitkisel kaynaklı maddelerin aktivite çalışmalarında ise aktivitenin kaynağı madde bilinmediği için sonuçlar dilüsyon olarak verilirken, referansla kıyaslamak yerine bitkilerin birbirleriyle kıyaslanmasına gidilmiştir<sup>36,37</sup>. Yeni ajanlar yerine, bilinen maddelerin MİK saptanması çalışmalarında da makrodilüsyon tekniği kullanılmıştır<sup>38,39</sup>. Yeşilada ve ark.<sup>41</sup>, bir seri ornidazol türevinin aktivitesini bu yöntemle saptarken, tek madde için agar dilüsyon yöntemini kullanmışlardır.

Çözünürlük problemi olan maddelerle çalışmada agar dilüsyon yöntemi tercih edilirken, tüberküloz bakterisi için de bu yöntem kullanılmaktadır<sup>17,28,41-47</sup>.

Uygulamadaki sorunların ve malzeme-materyal miktarının en aza indiği, en çok kullanılan yöntem mikrodilüsyon yöntemidir. Kantitatif sonuçlar vermesi bakımından tercih edilmektedir. Yurdumuzda MİK saptanması ile ilgili yapılmış çeşitli çalışmalar vardır<sup>48-55</sup>.

Disk difüzyon yöntemi, aktivite araştırmalarında kalitatif ön deneme çalışmalarında çok kullanılmaktadır<sup>14,37,56-61</sup>.

Branch ve ark.<sup>39</sup>, tüp dilüsyon ve difüzyon tekniklerini kıyaslamak için yaptıkları çalışmada sonuçların farklılık gösterdiğini saptamışlardır. Ünlü ve ark.<sup>32</sup> da iki farklı yöntemle aynı maddelerde farklı sonuçları bildirmişlerdir.

#### Sonuç

Araştırmalara bakıldığında tekniklerde tam bir standardizasyon uygulanmadığı kanısına varılabilir. Klinisyenlerin kullandığı duyarlılık testlerinin çokluğu nedeniyle problemlerin zaman içinde en aza indiği görülmektedir. Bu tip çalışmalarda kullanılan antimikrobiyal maddelerin tüm özellikleri bilinmekte, firmalar tarafından miktarları belirli kitler halinde laboratuvarlara ulaştırılmaktadır. Ayrıca mikroorganizma kaynağı hasta izolatlarıdır.

Standardize olmasında sorun olan aktivite çalışmaları, yeni maddelerin aktivitelerinin saptanması çalışmalarıdır. Yeni maddelerle çalışırken, de-

nenecek maddenin çözünürlüğü, etkili molekülün kimyasal, fizikokimyasal özellikleri, stabilitesi gibi bilinmeyenler, testi yönlendirebilmektedir. Seri halinde incelenen madde sayısının fazlalığı yöntem seçimini etkilerken seçilen yöntemin maddeye uygunluğu göz ardı edilmemelidir. Örneğin sadece asetonda çözünen bir madde tüp dilüsyonla test ediliyorsa, 36°C de asetonun kısa sürede uçması sonucunda, madde sulu besiyerinde çökecek ve inoküle edilen mikroorganizma üreyecektir. Sonuçta madde inaktif gibi görünecek ve hatalı yöntem seçiminden dolayı hatalı yargıya varılacaktır.

Örneğin 30 yeni maddeyle ve 8 mikroorganizma ile yapılan bir makrodilüsyon yönteminde, kullanılması gereken tüp sayısı (30x10 dilüsyon için, 300x8 m.o.serisi için) 2400 adettir. Buna çözücü, besiyeri ve mikroorganizma kontrol tüplerini de eklersek 2418 tüp gerekmektedir. Çalışmalar iki seri halinde yürütülmektedir. 2418x2= 4836 tüp gereği vardır. Dilüsyon için ayrı kullanılacak pipetler, sarf edilen besiyeri de düşünülürse israfın, emeğin fazlalığı abartılmış sayılmaz.

Çözünürlüğü çok az olan bir maddeden hazırlanan diskler, difüzyon yöntemiyle test edildiğinde zon oluşmaması ya da çok küçük çaplı zonlar oluşması maddenin etkisizliği olarak yanlış yarıtaçaktır.

Madde bazı hallerde sıvı besiyerinde çözüldüğünde bulanık bir görünüş almaktadır. Uygun inkubasyon süresi sonunda mikroorganizma üremesinin bulanıklıkla karar verileceği yöntemlerde buyyon ya da agar dilüsyon yöntemi seçilmemelidir. Dilüsyonları yapılan maddelerin katı besiyerine eklenmesi ve yüzeyine mikroorganizma inoküle edilmesi sonucu koloni oluşumu kolaylıkla beirlenebilir.

Son yıllarda tüm dünyada kabul görmüş mikrodilüsyon yöntemiyle israf en aza inmiştir. Otomatik yöntemlerin çok pahalı olduğu düşünülürse maddelere ve mikroorganizmalara uygunluk gösterdiğinde mikrodilüsyonun seçilmesi kaçınılmazdır. Ayrıca yeni maddelerle çalışırken kantitatif sonuçlar vermesi de seçim nedenleri arasındadır.

Çalışmalarımızdan vardığımız sonuçları değerlendirdiğimizde bilinen kurallara ek olarak şu önerileri sıralayabiliriz:

Yeni maddelerin denendiği her testde, aktifliği bilinen bir referans madde mutlaka denenmelidir. Referans maddenin potensinin bilinmesi, inaktif olmamasına özen gösterilmelidir.

Bir seri maddeyle çalışırken, maddelerin tümü aynı yöntemle test edilmelidir.

Madde sayısının fazla olduğu durumlarda, aynı gün bitirilemeyen testlerde referans madde yine denenmelidir. Testler en az iki seri halinde çalışılmalıdır. Viruslarla çalışırken dört seri tercih edilmelidir.

Yöntemlerin kıyaslanması amacını taşımayan çalışmalarda, tek yöntemle alınan sonuçlarda bir anormallik yoksa ikinci yöntemin denenmesi israftır.

Madde özel çözücüsünde çözülüp, sulu besiyeriyle dilüe edildikten sonra hiçbir şekilde çözücüsü uçurulmamalıdır. Maddenin başlangıç konsantrasyonu değişeceği gibi çökmelere de neden olunur.

Antibakteriyel aktivite çalışmalarında en az iki Gram(+), iki Gram(-) suş kullanılmalıdır. Antiviral aktivite testlerinde zarflı veya zarfsız hem DNA, hem RNA taşıyan virus kullanılmalıdır. Özel bir küf cinsine ait bir çalışma yapılmıyorsa, antifungal çalışmalar maya benzeri funguslarla yapılabilmektedir.

Konsantrasyonu bilinen tek bir maddeyle çalışıldığında MİK değerleri µg/ml olarak belirtilmelidir. Fakat çalışılan madde bir karışımsa ve aktiviteden sorumlu yapı bilinmiyorsa MİK değeri MID (Minimal İnhibisyon Dilüsyon) olarak verilmelidir.

Her yöntemde kullanılan çözücünün, besiyerinin, mikroorganizmanın kontrolleri mutlaka yapılmalıdır.

Mikroorganizmaların kültür koleksiyonlarından sağlanmasına özen gösterilmelidir. Belli kuruluşların bu konuda kolaylık göstermesi de dileğimizdir.

#### Kaynaklar

1. Hill, E.L., Ellis, M.N., Nguyen-Dinh, P., "Antiviral and Parasitic Susceptibility Testing", in Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J. (Ed). *Manual of Clinical Microbiology*, Am. Soc. Microbiol., 5. Ed., Washington, D.C., 1184-1191, 1991.

2. Saracoğlu, İ., "Bazı Triterpenik Saponozitlerin Antiviral Aktiviteleri" H.Ü. Ecz. Fak., Doktora Tezi, 1980.
3. Ersan, S., "Antiviral Etkili Bazı 3 ve 5-sübstitüe - 1, 2, 4-triazol Fürevlerinin Sentezleri ve Bunların Biyolojik Etkileri üzerinde Yapılan Çalışmalar" A.Ü. Ecz. Fak., Doktora Tezi, Ankara, 1982.
4. Perçiner, H., Abbasoğlu, U., Noyanalpan, N., "A Study on Antiviral 2-( $\alpha$ -hydroxybenzyl) Benzimidazole Derivatives" J. Fac. Pharm. Gazi, 7(2), 125-140, 1990.
5. Shadomy, S., Pfaller, M.A. "Laboratory Studies with Antifungal Agents" in Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D., Shadom, H.J. (Ed). *Manual of Clinical Microbiology*, Am. Soc. Microbiol., 5. Ed., Washington, D.C., pp. 1173-1183, 1991.
6. Kuştımur, S., Kutluay, L., Yavuz, S., "Flukonazolün *Candida albicans* Suşlarına Etkinliğinin İn-vitro Mikrodilüsyon Yöntemi ile Araştırılması" FABAD, Farm. Bil. Derg., 18, 157-159, 1993.
7. Çetin, E.T., Gürler, N., "Bakterilerin Antibiyotiklere Duyarlık Deneyinin Yapılması", *Kökem Derg.*, 12(2), 97-105, 1989.
8. Sahm, D.F., Washington, J.A., "Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution Methods" in Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J., (Ed). *Manual of Clinical Microbiology*, Am. Soc. Microbiol., 5. Ed., Washington, D.C., pp. 1105-1116, 1991.
9. Barry, A.L., Thornsberry, C., "Susceptibility Tests: Diffusion Test Procedures" in Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D., Shadom, H.J. (Ed). *Manual of Clinical Microbiology*, Am. Soc. Microbiol: 5. Ed., Washington, D.C., pp. 1117-1125, 1991.
10. Bilgehan, H., "Antibiyotikler ve Mikroorganizmalar" *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, Fakülteler Kitabevi, 135-171, 1992.
11. "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically" National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Approved Standarts, M7-A Villanova, Pa., 1985.
12. Thornsberry, C., Gavan, T.L., Gerlach, E.H., "New Developments in Antimicrobial Agent Susceptibility Testing" *Cumitech 6*, Am. Soc. Microbiol., Washington, pp. 1-14, 1977.
13. Wick, W.E., "Influence of Antibiotic Stability on the Results of in Vitro Testing Procedures" J. Bacteriol., 87(8), 1162-1170, 1964.
14. Gürler, N., Sarpel, C., Gürler, B., Çetin, E.T., Töreci, K., "Anaerob Bakterilerin Sıvı Besiyerinde Disk Yöntemi ile Kemoterapötiklere Duyarlığı", *Ankem Derg.*, 2(2), 115, 1988.
15. Jorgensen, J.H., "Antibacterial Susceptibility Tests: Automated or Instrument-Based Methods" in Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J. (Ed). *Manual of Clinical Microbiology*, Am. Soc. Microbiol., 5. Ed., Washington, D.C., pp. 1166-1172, 1991.
16. Abbasoğlu, U., Şener, B., Günay, Y., Temizer, H., "Antibacterial activity of Some Isoquinoline Alkaloids", *Arch. Pharm.*, 324, 379-380, 1991.
17. Banoğlu, E., Abbasoğlu, U., Şahin, M.F., "Studies on Some 2-substituted Benzimidazole Derivatives and Their Antimicrobial Activity", J. Fac. Pharm. Gazi, 10(1), 1-13, 1993.
18. Bilgin, A., Palaska, E., Abbasoğlu, U., "Bazı Şalkon Türevlerinin Sentezleri ve Antifungal Etkileri Üzerinde Araştırmalar," *FABAD, Farm. Bil. Derg.*, 16, 81-87, 1991.
19. Çakır, B., Uçucu, Ü., Büyükbingöl, E., Abbasoğlu, U., Noyanalpan, N., "Bisbenzothiazole Derivatives and Their Antifungal Activities", J. Fac. Pharm. Gazi, 4(2), 143-149, 1987.
20. Çakır, B., Büyükbingöl, E., Uçucu, Ü., Abbasoğlu, U., Noyanalpan, N., "Benzimidazole Derivatives: Bisbenzimidazoles and Their Antifungal Activities", J. Fac. Pharm. Gazi, 5(1), 71-77, 1988.
21. Çakır, B., Uçucu, Ü., Abbasoğlu, U., "Benzimidazole Derivatives: 5-chloro-2, 2'-bisbenzimidazoles, Synthesis, Antifungal Activities and QSARS" J. Fac. Pharm. Gazi, 5(1), 105-110, 1988.
22. Çakır, B., Uçucu, Ü., Büyükbingöl, E., Abbasoğlu, U., "Benzoxazoles: Bis-benzoxazole Derivatives, Synthesis, Antifungal Activities and QSARS", J. Fac. Pharm. Gazi, 6(1), 15-21, 1988.
23. Darafarin, A., Abbasoğlu, U., Şahin, M.F. % "Synthesis and Antimicrobial of Some 2-mercaptobenzimidazole Derivatives", J. Fac. Pharm. Gazi, 9(2), 97-106, 1992.
24. Gümüş, F., Özden, S., Özden, T., Abbasoğlu, U., "Synthesis and In-vitro Antibacterial Activities of Some 2-benzylbenzimidazole Derivatives", J. Pharm. Belg., 43(6), 450-454, 1988.
25. İkizler, A., Gümüş, F., Özden, S., Abbasoğlu, U., "Biological Activites of Some 1, 2, 4-triazoles and 1, 2, 4-triazolin - 5 ones", *Die Pharmazie*, 44, 506-507, 1989.
26. Noyanalpan, N., Berçin, E., Çakır, B., Abbasoğlu, U., "Benzimidazole Derivatives: (2-benzylidene hydrazino)-benzimidazoles Synthesis and Antifungal Activities", J. Fac. Pharm. Gazi, 4(1), 33-45, 1987.
27. Noyanalpan, N., Berçin, E., Çakır, B., Abbasoğlu, U., "Benzothiazoles: Synthesis and Antifungal Activity", J. Fac. Pharm. Gazi, 4(1), 47-56, 1987.
28. Önkol, T., Abbasoğlu, U., Şahin, M.F., "Antimicrobial Activities of Some (2-benzimidazolythio) acetohydrazide Derivatives", J. Fac. Pharm. Gazi, 9(1), 47-57, 1992.
29. Saraç, S., Şafak, C., Erdoğan, H., Abbasoğlu, U., Günay, Y., "4-substituted phenoxacetic acid Derivatives and Their Antimicrobial Activities", H.Ü. J. Fac. Pharm., 11(1), 1-11, 1991.

30. Şafak, C., Türel, A., Abbasoğlu, U., "Synthesis and Antimicrobial Activities of Some S-(benzimidazole-2-ylmethyl) N,N disubstituted dithiocarbamates", *Doğa-Tr. J. Pharm.*, 1, 128-137, 1991.
31. Erol, D., Bilgin, A., Yuluğ, N., İstanbullu, İ., "Bazı 2-hidrazinotiyazol Türevlerinin Antifungal ve Antibakteriyel Etkileri Üzerinde Çalışmalar", *H.Ü. Ecz. Fak. Derg.*, 8(2), 53-57, 1988.
32. Ünlü, S., Erdoğan, H., Yuluğ, N., "5-kloro-2(3H)-benzoksazolone Türevi Yeni Mannich Bazları ve Bunların Antibakteriyel Etkinlikleri", *H.Ü. Ecz. Fak. Derg.*, 7(1), 25-38, 1987.
33. Ünlü, S., Erdoğan, H., Yuluğ, N., "Bazı 5-kloro-2(3H)-benzoksazolone Türevlerinin Antifungal Etkilerinin Araştırılması", *H.Ü. Ecz. Fak. Derg.*, 7(2), 65-72, 1987.
34. Şafak, C., Erdoğan, H., Palaska, E., Ertan, M., Yuluğ, N., "Synthesis of Some 2-arylidenehydrazinone-4-(2-naphthyl) thiazoles and Their Antimicrobial Properties", *H.Ü. Ecz. Fak. Derg.*, 9(1), 13-19, 1989.
35. Durutürk, L., Abbasoğlu, U., "Camphorated Parachlorophenolün Antibakteriyel Etkinliği", *A.Ü. Diş Hek. Derg.*, 15(2), 163-165, 1988.
36. Şener, B., Bingöl, F., Abbasoğlu, U., "Screening of Some Plants from Anatolia for Antifungal Activity", *J. Fac. Pharm. Gazi*, 5(1), 55-64, 1988.
37. Şahinkaya, H., Akın, S., Abbasoğlu, U., Bingöl, F., "Alnus glutinosa Gaertner'nin Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması," VI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, 337-344, 1987.
38. Tan, E., Johansson, C.B., "Sisomisinin Antibakteriyel Etkisinin Gentamisin ile Karşılaştırılması", *Türk Mikrobiol. Cem. Derg.*, 19(1), 6-16, 1989.
39. Branch, A., Starkey, D.H., Power, E.E., "Diversifications in the Tube Dilution Test for Antibiotic Sensitivity of Mikroorganisms", *App. Mikrobiol.*, 13(3), 469-472, 1965.
40. Marinis, E., Legakis N.J., "Invitro Activity of Ciprofloxacin Against Clinical Isolates of Mycobacteria Resistant to Antimycobacterial Drugs", *J. Antimicrobial Chem.*, 16, 527-530, 1985.
41. Yeşilada, A., Saraç, S., Ertan, M., Willke, A., "Studies On Some New Ornidazole Derivatives", *H.Ü. J. Fac. Pharm.*, 12(1), 13-21, 1992.
42. Arçay, N., Şafak, C., Abbasoğlu, U., "Bazı Benzoksazol-2-Tiyon Türevleri Üzerinde Çalışmalar", *H.Ü. Ecz. Fak. Derg.*, 12(1), 33-46, 1992.
43. Bakıcı, M.Z., Bakır, M., Yalçın, N., "Mycobacterium Tuberculosis Suşlarının Antituberkuloit İlaçlara Direnç Durumları", *Inf. Derg.*, 7(1-2), 91-93, 1993.
44. Erdoğan, H., Yuluğ, N., "3,6-Diaçilbenzoksazoloneların Antifungal Etkilerinin Araştırılması", *H.Ü. Ecz. Fak. Derg.*, 6(1), 1-6, 1986.
45. Gümüş, F., Özden, S., Özden, T., Abbasoğlu, U., "2,4,5-Trisubstitüe 2-fenil-benzimidazol Türevleri ve Invitro Tüberkülostatik Aktivite Çalışmaları", *A.Ü. Ecz. Fak. Derg.*, 16(1), 1, 1986.
46. Arçay, N., Şafak, C., Abbasoğlu, U., "Bazı Benzoksazol-2-Tiyon Türevlerinin N-Mannich Bazları ve Bunların Antimikrobiyal Etkileri", *H.Ü. Ecz. Fak. Derg.*, 12(1), 1-12, 1992.
47. Ulusoy, S., Özinel, M.A., Tokbaş, A., "İmipenem'in Çeşitli Bakterilere Karşı In Vitro Etkinliğinin Araştırılması", *Inf. Derg.*, 7(1-2), 137-138, 1993.
48. Coşkun, D., Çokça, F., Tural, D., Altay, G., "Koağulaz Pozitif ve Negatif Stafilokokların Penisilin, Oksasilin, Linkomisin ve Vankomisine Duyarlılıkları", *Ankem Derg.*, 2(2), 113, 1988.
49. Göral, M., Can, A., Johansson, C.B., Söyletir, G., Okar, İ., Çelik, C., "Gram Negatif Çomakların Aminoglikozid Grubu Antibiyotiklere İn-vitro Duyarlılıkları", *Ankem Derg.*, 3(4), 543-546, 1989.
50. Abbasoğlu, U., Küsmenoğlu, Ş., "Antibacterial and Antifungal Studies on Achillea L. Species", *J. Fac. Pharm. Gazi*, 11(2), 177-181, 1994.
51. Perçiner, H., Yıldır, İ., Abbasoğlu, U., Akgün, H., Şahin, M.F., Noyanalpan, N., "Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Hydrazones of ((2-benzoxazolylthio)aceto) hydrazide I", *J. Fac. Pharm. Gazi*, 10(2), 163-172, 1993.
52. Perçiner, H., Yıldır, İ., Abbasoğlu, U., Şahin, M.F., Noyanalpan, N., "Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Substituted Benzothiazole Derivatives", *J. Fac. Pharm. Gazi*, 10(2), 117-126, 1993.
53. Ünlü, S., Abbasoğlu, U., Şahin, M.F., "Some New Amide Derivatives of (2-benzoxazolinone-2yl) acetic Acids", *J. Fac. Pharm. Gazi*, 11(2), 167-176, 1994.
54. Pilli (Ayyıldız), G., Şafak, C., Abbasoğlu, U., "Sydnone Derivatives: Synthesis and Antimicrobial Activity", *Arch. Pharm.*, 326, 559-561, 1993.
55. Ayyıldız, A., Balkan, R., Babacan, M., "İdrar Yolu Enfeksiyonlarından İzole Edilen E.colilerin Üçüncü Kuşak Sefalosporinler ve Ofloksazine Duyarlılıklarının İn Vitro Araştırılması", *Türk Mikrobiol. Cem. Derg.*, 19(1), 1-5, 1989.
56. Berkiten, R., Ağaçfidan, A., Mustafa, J.M., "Boğaz Salgılarından İzole Edilen Beta Hemolitik streptokoklar ve Kemoterapötiklere Duyarlılığı", *Ankem Derg.*, 3(4), 564-568, 1989.
57. Erdoğan, H., Şafak, C., Balkan, A., Palaska, E., Yuluğ, N., "Studies on Some S-(3-methylbenzoxazolone-6-yl) Acetyl/Propionyl 4-substituted Piperazinocarbamodithioic Acid Derivatives", *H.Ü. J. Fac. Pharm.*, 11(1), 13-20, 1991.
58. Mete, M., Arıkan, E., "Antibiyotik Sağaltımındaki Çocuklarda Ağız ve Barsakta Candida Kolonizasyonu ve Candida Suşlarının Nistatine İn Vitro Duyarlılığı", *Inf. Derg.*, 7(1-2), 115-119, 1993.
59. Tuncer, İ., Baysal, B., Erboyacı, A., "Değişik Klinik Örneklerden Üretilen Klebsiella Cinsi Bakterilerin Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılıkları", *Ankem Derg.*, 3(4), 574-577, 1989.
60. Abbasoğlu, U., Pulat, M., "Investigation of Water and Antimicrobial Agent Permeation of Polyurethane Membranes in Relation to Their Surface Properties", *FABAD, J. Pharm. Sci.*, 19, 1-4, 1994.
61. Akalın, E., Köksal, İ., Kardeş, T., Baykal, M., "Çeşitli Antibiyotiklerin Gram Negatif Bakterilere İn-Vitro Aktiviteleri", *Ankem Derg.*, 1(1), 79-84, 1987.