

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı

Danışman:
Prof Dr Kurtuluş TÖRECI

MINİMAL İNHİBİTÖR KONSANTRASYON ALTINDA VE ÜSTÜNDEKİ
ANTİBİYOTİK KONSANTRASYONLARINA MARUZ BIRAKILAN
ENTEROKOKLARDA BETA-LAKTAM VE AMİNOGLİKOZİD
ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DİRENÇ
GELİŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

M.Sc. A. Suat SARIBAŞ

İstanbul - 1996

Çok sevdiğim mikrobiyoloji alanında çalışma olanağı sağlayan, üstün bilgilerinden her zaman yararlandığım, tez konumun seçiminde, yürütülmesinde ve yönlendirilmesinde çok kıymetli desteklerini ve teşviklerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof Dr Kurtuluş TÜRECİ'ye en içten teşekkürü borç bilirim.

Yakın ilgilerini gördüğüm bilgi ve deneylerinden her zaman yararlandığım değerli hocalarım Sayın Prof Dr Özdem ANĞ'a, Prof Dr Ömer KASIMOĞLU'na, Prof Dr Rahmiye BERKİTEN'e, Prof Dr Ergene BÜGET'e, Prof Dr Şengül DERBENTLİ'ye, Prof Dr Selim BADUR'a, Prof Dr Bülent GÜRLER'e ve tez çalışmalarımda çok kıymetli desteğini gördüğüm Doç Dr Nezahat GÜRLER'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
GEREÇ VE YÖNTEM	23
BULGULAR	27
TARTIŞMA	38
SONUÇLAR	45
ÖZET	47
SUMMARY	49
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	60

GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

ENTEROKOKLAR HAKKINDA GENEL BİLGİ

Sherman, 1937 yılında D grubu streptokokları, *S.faecalis* ve *S.faecium* olarak sınıflandırmıştır. 1970 yılında Kalina, *S.faecalis* ve *S.faecium*'u *Enterococcus* cinsine koymuştur (30).

Enterokok ismi ilk olarak 1899 yılında Thiercelin tarafından Fransa'da yayınlanan bir makalede kullanılmıştır. Bu ismin kullanılış amacı yeni bulunan Gram pozitif diplokok olan bir bakterinin intestinal orijinli olduğunu vurgulamaktadır. 1906 yılında Andrews ve Harder, endokarditli bir hastanın dışkılarından *Streptococcus faecalis*'i izole etmişler, 1919 yılında Orla-Jensen *S.glycerinococcus* ve *S.faecium*'u tanımlamıştır. Sherman ise streptokokları piyojenik, viridans, laktik ve enterokoklar olmak üzere 4 gruba ayırmıştır.

Enterokoklar, 10-45°C arasında üreyebilen, % 6.5 NaCl'li ortamlarda da üremelerini sürdürebilen, 60°C'de 30 dakika canlı kalabilen ve eskülini hidrolize edebilen bakterilerdir. Enterokoklar, Lancefield tarafından yapılan serolojik şemaya göre D grubu streptokoklar (enterokoklar) olarak gösterilmişlerdir. Sherman sınıflandırmasında, *S.faecalis*, *S.zymogenes*, *S.liquefaciens* ve *S.durans* enterokok grubunda yer almışlardır. Bunlardan ilk üçünün benzerliği yüzünden uygun terminoloji şöyle oluşmuştur: *S.faecalis* (hemoliz negatif, proteolizis negatif), *S.faecalis* var.*liquefaciens* (hemoliz negatif, proteolizis pozitif), *S.faecalis* var.*hemolyticus* (hemoliz pozitif, proteolizis negatif), *S.faecalis* var.*zymogenes* (hemoliz pozitif, proteolizis pozitif) ve *S.durans*. Son çalışmalar hemolizin plazmid kaynaklı olduğunu ve non-hemolitik suşlara transfer edilebileceğini göstermiştir (44).

1940 ve 1950'lerde, *S.faecium*'un *S.faecalis*'ten ayrı biyokimyasal özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. *S.faecium*, potasyum tellüritle inhibe olmakta fakat tetrazoliumu formozona redükte edememektedir. 1984 yılında DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyon deneyleriyle *S.faecalis* ve *S.faecium*'un streptokoklardan ayrı olarak *Enterococcus* cinsine aktarılması önerilmiştir. Daha sonra bu cins içindeki bakteriler *E.faecalis*, *E.faecium*, *E.durans*, *E.avium*, *E.casseliflavus*, *E.malodoratus*, *E.gallinarum*, *E.hirae*, *E.mundtii*, *E.raffinosis*, *E.solitarius*, *E.pseudoavium* olarak çeşitli türlere ayrılmışlardır (44). *E.raffinosis* ve *E.solitarius*, 1989 yılında Facklam ve Collins (12)'in çalışmalarıyla tanımlanmışlardır.

Enterokoklar, Gram pozitif ve fakültatif anaeropturlar. Şekilleri ovoid olup kısa zincirler veya çiftler halinde, bazen de tek tek bulunurlar. Sitokrom enzimleri olmadığı için katalaz negatiftirler. *E.faecalis*, Lys-Ala 2-3 tipinde bir peptidoglikana sahipken, *E.faecium* Lys-D-Asp tipinde bir peptidoglikana sahiptir (44). Bütün enterokok türleri PYR (pyrrolidonyl arylamidase) ve LAP (leucine aminopeptidase) pozitifler. BE (bile-eskülin) pozitif olup % 6.5 NaCl'ye tolerandırlar. 10-45°C'ler arasında üreyebilirler. Glikozdan gaz oluşturmazlar. Çoğu vankomisine duyarlı olup D grubu antijenine sahiptirler (13).

Enterokok cinsindeki türler bazı karbonhidratlara etkilerine ve arginin hidrolizine göre 3 gruba ayrılırlar (13) :

1. grup türleri olan *E.avium*, *E.malodoratus*, *E.raffinosis* ve *E.pseudoavium*, mannitol, sorbitol ve sorbozdan asit oluşturur, arginini hidrolize etmezler.

2. grup türleri olan *E.faecalis*, *E.solitarius*, *E.faecium*, *E.casseliflavus*, *E.mundtii* ve *E.gallinarum*, arginini hidrolize ederler, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitolde farklı özellikler gösterirler.

3. grup türleri olan *E.durans*, *E.hirae* ve bir *E.faecalis* varyantı arginini hidrolize ederler, karbonhidratlardan asit oluşturmazlar. *E.faecalis*, tellürite tolerans gösterir ve piruvatı kullanabilir (13).

Enterokokların iki türü, *E.faecalis* ve *E.faecium*, insan infeksiyonlarından en sık izole edilen türlerdir. Klinik olarak izole edilen enterokokların büyük çoğunluğu *E.facealis*(% 80-90)'tir. *E.faecium* daha az (% 5-10) olarak izole edilir. Muayene maddelerinden daha az sıklıkta *E.avium*, *E.raffinosis* ve *E.gallinarum*'un izole edildiği bildirilmiştir. *E.solitarius*, *E.casseliflavus*, *E.mundtii*, *E.durans*, *E.hirae* ve *E.faecalis* varyantı insanlardan çok seyrek izole edilmişlerdir. *E.malodoratus* ve *E.pseudoavium* insan infeksiyonlarından izole edilmemişlerdir (13).

Enterokoklar sağlıklı insanların dışkılarında, daha az olarak vajına ya da ağızda bulunurlar (44).

Enterokokların virulans faktörleri aşağıda belirtilmiştir:

Agregasyon maddesi: *E.faecalis* ve *E.faecium*'da bulunur; alıcı ve verici hücreler arasında feromon cevabını kolaylaştırır. Arg-Gly-Asp motiflerine bağlanarak renal tübüler hücrelere bağlanmayı güçlendirir. Sitolizin ile birlikte tavşan endokarditinde mortaliteyi artırır.

Feromonlar: *E.faecalis*'te bulunur; *in - vitro* nötrofiller için kimyasal olarak çekicidirler.

Sitolizin: *E.faecalis* ve *E.faecium*'da bulunur; bazı Gram pozitif bakteriler ve bazı ökaryotik hücreler için litik aktivite gösterir.

Lipoteikoik asit: Bütün enterokoklarda bulunur, insan monositlerinde sitokin üretimini stimüle eder.

Proteaz: *E.faecalis*'te bulunur; çinko endopeptidaz aktivitesi gözlenmiştir.

Hiyolüronidaz: *E.faecalis*'te bulunur; mukopolisakkarit yapısındadır.

AS-48: *E.faecalis*'te bulunur, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı bakteriyosin aktivitesi göstermektedir. Proteaz, hiyolüronidaz ve AS-48 faktörlerinin fonksiyonları, *in-vitro* ve *in-vivo* infeksiyon modellerinde henüz denenmemiştir (32).

ENTEROKOKLARIN NEDEN OLDUĞU İNFEKSİYONLAR

Enterokoklar, insan ağız boşluğunun, intestinal sistemin ve vajinanın kommensal bakterileridir. İnsan dışkısında 10^5-10^7 cfu/g kadar bulunurlar ve normal barsak florasının %0.01 kadarını oluştururlar (32).

Enterokoklarla en sık üriner sistem infeksiyonları meydana gelir. Enterokoklar ayrıca önde gelen endokardit etkenleri arasında yer alırlar. Enterokoklar nozokomiyal infeksiyonlara da neden olurlar. Bakteriyemi, salpenjit, endometrit, peritonit, safra yolu infeksiyonları, karın içi abseler, bazen meninjit gibi çeşitli infeksiyonlardan da enterokok suşları izole edilmiştir. Yenidoğan sepsisi ve meninjitinde, B grubu streptokoklar ve E.coli'den sonra 3. sıklıkta rastlanan etken oldukları söylenebilir (61).

E.faecalis insandaki enterokok infeksiyonlarının % 80-90'ından sorumludur. Geri kalan infeksiyonların büyük bir kısmını E.faecium, daha az bir kısmını da E.avium, E.casseliflavus, E.durans, E.gallinarum, E.hirae, E.mundtii, E.raffinosis ve E.solitarius meydana getirmektedir (32).

Üriner sistem infeksiyonları

Bu infeksiyonların büyük çoğunluğu nozokomiyal olup, üriner sistemdeki anomaliler ve katater kullanımı ile ilişkili olarak bulunmuştur (32). Bazı enterokok suşları özel bir agregasyon maddesi üretirler. Bu madde renal tübüler hücrelere yapışmayı sağlayarak üriner sistem infeksiyonlarının oluşmasını kolaylaştırır. Bu madde fibronektine benzer bir madde olup, ökaryotik hücrelere integrin reseptörleri aracılığı ile bağlanmaktadır (42).

İdrarda genel olarak 10^5 cfu/ml bakteri bulunması infeksiyon işareti olarak alınmakta ise de bazen üriner infeksiyonlu hastaların idrarlarında daha az sayıda enterokok saptanır. Bunun nedeni enterokokların zincirler halinde bulunması ve her zincirin besiyerinde tek bir koloni meydana getirmesidir. Enterokoklarla oluşan üriner sistem infeksiyonları sıklıkla hastanede yatan hastalarda görülmekte olup olguların

1/3'ünde piyelonefrit meydana gelmektedir (47). Katater ve özellikle enterokoklara etkisiz olan sefalosporinler gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılması bu tip infeksiyonlarda bir artışa neden olmuştur (14).

Endokardit

Enterokoklar, bakteriyel endokarditlerin % 10-15'inden sorumludurlar (39). Hastalık cerrahi yolla veya manipülasyonlarla gastrointestinal sistemden veya çoğunlukla da ürogenital sistemden kaynaklanır. Bu sebeple endokardit olgularına genellikle çeşitli jinekolojik prosedürler sonucu bakteriyemi oluşan genç kadınlar ve prostat problemi olan yaşlı erkekler arasında rastlanır. Enterokokların oluşturduğu endokardit olgularının % 95'inden E.faecalis sorumludur (47).

Bakteriyemi

Enterokoklar tarafından meydana getirilen en yaygın üçüncü infeksiyondur. Çoğunlukla üriner sistem infeksiyonlarından ve intraabdominal sepsisten kaynaklanan enterokoklar, kan dolaşımına girerek bakteriyemi meydana getirirler. Bu hastaların 1/3'ünde endokardit de oluşur (42). Graniger ve Ragette (20) nozokomiyal bakteriyemi olgularında en yaygın giriş yerinin % 25 oranında üriner sistem olduğunu tespit etmişlerdir. Bakteriyemide sefalosporinlerin paranteral olarak kullanılması da süperinfeksiyonlara yol açar.

Hastane infeksiyonları

Enterokok, E.coli'den sonra nozokomiyal infeksiyonlara ikinci sıklıkta neden olan bakteridir. Eskiden bir çok enterokok infeksiyonunun hastanın kendi barsak florasından kaynaklandığı düşünülmekteydi. Son çalışmalar, dirençli bir enterokok suşunun hastanelerde hastadan hastaya yayılabileceğini göstermiştir. Bu dirençli suşlar hastane personeli vasıtasıyla da yayılabilir (42). Eksojen kaynaklı ve patojen olan enterokok suşları, kolonize olma, çok daha fazla üreme konak dokularına yayılma ve yayıldıkları yerde ısrarla kalıcı olma gibi özellikleri ile normal florada bulunan enterokoklardan farklı özellikler göstermişlerdir (32).

Enterokoklar yumuşak dokuları, paranasal sinüsleri, kulağı da infekte edebilmektedirler. Böbreklerdeki infeksiyonlar özellikle üriner sisteminde yapısal anomali bulunan ve katater kullanan hastalarda görölmektedir (32).

ENTEROKOK İNFEKSİYONLARINDA KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER

Enterokoklar, penisilinlere az duyarlı, sefalosporinlere ise duyarsızdır. İdrar yolu infeksiyonlarının veya yumuşak doku infeksiyonlarının tedavisi nispeten kolaydır. Ampisilin, kinolonlar, gerekirse vankomisin kullanılabilir. Ancak bakteriyemi ve endokardit gibi infeksiyonların tedavisinde çok daha ciddi sorunlar vardır (61).

Enterokoklar bütün beta-laktam antibiyotiklere karşı tolerandırlar. MİK'un çok üzerindeki konsantrasyonlarda bile ölmezler. Sefalosporinler ise enterokoklara karşı çok zayıf bir aktivite gösterirler ve kullanılmaları süperinfeksiyonlara neden olur (44).

Ampisilin enterokoklara karşı penisilinden daha aktiftir. Eritromisin ve klindamisin ise enterokoklar üzerine genellikle etkisizdir (47).

Aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı düşük düzeyde bir dirence sahip olmak enterokokların intrinsik bir özelliğidir (44). Enterokoklar membranlarında çok düşük elektrik potansiyeline sahip oldukları için aminoglikozidlerin bakteriye yeterince penetre olmaları zorlaşır. Penisilin grubundan bir antibiyotikle bir aminoglikozidin kombinasyonunda, penisilin membrandan geçiş potansiyelini yükselterek aminoglikozidlerin hücre içerisine girişini artırmaktadır (67).

Enterokoklarda hem beta-laktam grubu hem de aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı intrinsik direnci yenmek, ancak bu iki antibiyotiği kombinasyon şeklinde kullanmakla mümkündür (34). Penisilin bakterinin hücre duvarında yaptığı sınırlı tahribat ve membrandan geçiş potansiyelini yükseltmesi, permeabilityyi artıracak ve bunun sonucu bakteriye giren aminoglikozid

bakterisidal etkisini gösterecektir (61). Aminoglikozidlerle yapılan kombinasyonlarda beta-laktam antibiyotiğın yerine yine hücre duvarı sentezi inhibitörü olan vankomisin de kullanılabilir (70).

Enterokokların neden olduğu üriner sistem, yumuşak doku ve karışık infeksiyonlar tek bir ilaçla başarılı bir şekilde tedavi edilebilirler. Ampisilin, penisilin veya vankomisin tercih edilen antibiyotiklerdir (44). Vankomisin penisiline karşı alerjisi olan hastalarda aminoglikozidlerle kombinasyon şeklinde kullanılmaktadır (47).

Enterokokal meninjit olgularında intravenöz ampisilin uygulanması başarılı sonuçlar vermiştir. Bakteriyemide ise ampisilin kullanılabilirse de penisiline duyarlı suşlar için penisilin de kullanılabilir. Enterokokların oluşturduğu bazı endokardit olguları sadece penisilin kullanılarak tedavi edilmiştir. Bazı hastalarda ise penisilin ile yapılan tedaviden başarılı sonuçlar alınmamıştır. Bu durum yüksek doz penisilin kullanıldığı zaman bile geçerliliğini korumuştur. Bu tür olgularda penisilin streptomisin ile kombinasyonu daha başarılı olmuştur (44).

Ciddi enterokok infeksiyonlarının tedavisinde ortaya çıkan başka bir durum bazı enterokok suşlarının aminoglikozidlere ve beta-laktamaz oluşturarak veya oluşturmadan penisinlere karşı yüksek düzeyde direnç göstermesidir. Bu suşlarla olan infeksiyonların tedavisinde ancak vankomisin başarı sağlayabilir (61). Vankomisin yerine daha uzun bir plazma yarı ömrüne sahip olan teikoplanin endokardit olgularında daha başarılı sonuçlar vermektedir (11). Bunun yanında enterokoklarda vankomisin direncine de rastlanması durumu daha ciddi kılmaktadır (61). Sığanlarda deneysel olarak ampisilin ve vankomisine dirençli bir E.faecium suşuyla meydana getirilmiş endokardit, siprofloksasinin hem gentamisin hem de rifampisin kombinasyonları kullanılarak tedavi edilmiştir (66).

Gentamisine yüksek düzeyde direnç gösteren enterokok suşlarına karşı, teikoplanin-meropenem-gentamisin ve teikoplanin-sparfloksasin-gentamisin kombinasyonları ikili kombinasyonlara kıyasla daha iyi sonuçlar vermektedir (15).

Eng ve arkadaşları (10) hem ampisiline hem de vankomisine dirençli olan suşları siprofloksasine de dirençli bulurken, tetrasiklinlere duyarlı bulmuşlar ve bu durumu araştırma yapılan klinikte tetrasiklinin az kullanılmasına bağlamışlardır.

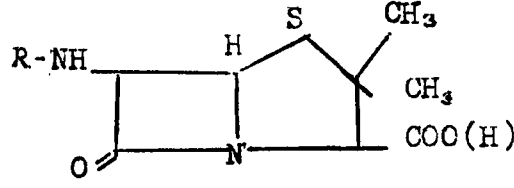
Yüksek düzeyde aminoglikozid direncine sahip enterokok suşlarının oluşturduğu bir endokardit olgusunda ampisilin aralıklı dozlarla uygulanışı değil de devamlı olarak uygulanması daha etkili olarak bulunmuştur (29).

Novobiosinin, siprofloksasin ile kombinasyonları yüksek düzeyde ampisilin, vankomisin ve gentamisine dirençli suşlarla oluşan infeksiyonlarda izole edilen Enterococcus faecium suşlarına karşı, belirgin bir biçimde in-vitro aktiviteye sahip olarak bulunmaktadır (35).

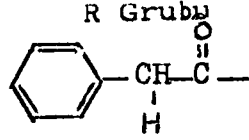
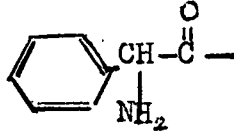
ÇALIŞMADA KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER HAKKINDA GENEL BİLGİ

Penisilinler

"Penisilinler" doğal ve yarı sentetik antibiyotiklerin bulunduğu bir grup antibiyotiğin genel adıdır. Orijinal antibiyotikler Penicillum notatum ve P.chrysogenum'dan elde edilmiştir. Gruptaki bütün antibiyotikler aynı temel yapıya sahiptirler. 6-aminopenisilanik asit, bir tiazolidin halkası ve serbest bir amino grubu içeren beta-laktam halkasından oluşmaktadır. 6-aminopenisilanik asidin ve ondan türetilmiş olan penisilin G ile ampisilin yapıları aşağıda gösterilmiştir (56,70).



6-Aminopenisilanik Asit

Benzilpenisilin
(Penisilin G)

Ampisilin

6-aminopenisilanik asit ve ondan türetilmiş olan penisilin G ile ampisilin yapısı.

Penisilin G, en yaygın şekilde kullanılan ucuz bir antibiyotiktir. Toksikitesi azdır ve Gram pozitif bakterilere karşı oldukça etkilidir. Gram negatif bakterilerden Neisseria cinsi dışındakiler bu antibiyotiğe genellikle dirençlidir. Mide asidinde kolayca parçalandığı için oral yoldan kullanılmaz. Penisilinaz tarafından inaktive edilir. Yaklaşık olarak 30 tane yarı-sentetik penisilin üretilmiştir ve klinik kullanıma sunulmuştur (56). Ampisilin bir çok Gram negatif bakteriye karşı etkilidir, oral olarak kullanılabilir fakat penisilinaz inaktivasyonuna duyarlıdır. Ampisilin ve amoksisilin enterokok ve L.monocytogenes'e karşı penisilin G'den daha aktiftirler. H.influenzae ve H.parainfluenzae'ya karşı da etkilidirler. Penisilinler, peptidoglikan sentezini PBP'lere bağlanarak inhibe etmek suretiyle aktivitelerini gösterirler (70).

Enterokok suşları için, ampisilin ve penisilin G'nin standart MİK değerleri aşağıda gösterilmiştir (46).

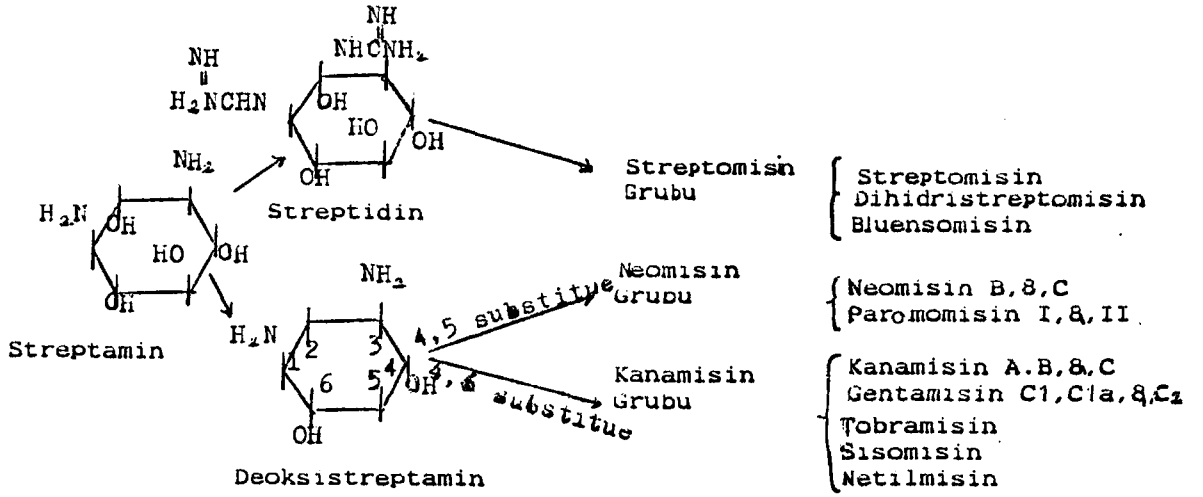
	<u>Duyarlı</u>	<u>Orta derecede duyarlı (mg/l)</u>	<u>Orta</u>	<u>Dirençli (mg/l)</u>
Ampisilin	-	≤ 8	-	≥ 16
Penisilin G	-	≤ 8	-	≥ 16

Orta derecede duyarlı kategorisi, endokardit ve diğer ciddi derin doku infeksiyonlarında enterokoklara karşı yüksek dozda penisilin veya ampisilin kullanılmasının ve bir aminoglikozidle kombinasyon yapılarak bakterisidal etkinin sağlanmasının gerektiğini ifade etmektedir (46).

Aminoglikozidler:

1943 yılında streptomisin keşfi, tedavi açısından kullanışlı antibiyotiklerin geliştirilmesinde bir dönüm noktası olmuştur. Streptomyces ve Micromonospora'lar çeşitli aminoglikozid antibiyotikleri üretmektedirler. Micromonospora'dan elde edilen gentamisin ve sisomisinde "mycin" yerine "micin" eki kullanılır.

Yapı olarak aminoglikozidler, aminosiklitole (aminosubstitutesiklik polialkol) bağlanma gösteren iki ya da daha fazla aminoşeker içerirler. Spektinomisin ise sadece aminosiklitol içermektedir. Bir aminoglikozid molekülünün aminosiklitol bölümü, streptaminin iki türevini içermektedir. Bunlar, streptidin ve deoksistreptamindir. Deoksistreptamini içeren grup ikiye ayrılır. Bu gruplar neomisin ve kanamisin grubudur (24).



Aminosiklitol halkasına göre aminoglikozidlerin gruplandırılması.

Aminoglikozid antibiyotikler iki değişik mantar grubu tarafından üretilmektedir (1):

Streptomyces grubu	Micromonospora grubu
Streptomisin	Gentamisin
Neomisin	Sisomisin
Kanamisin	Netilmisin
Tobramisin	
Amikasin	

Aminoglikozidler, ribozomlarda protein sentezini inhibe ederler. Streptomisin yalnız 30S alt birime bağlanırken, diğer aminoglikozidler 50S alt birimine de bağlanabilirler. Kanamisin ve neomisin grubunda ise mRNA'daki genetik bilginin translasyonu sırasındaki translasyonu engelleme etkileri de görülmektedir. Genetik kodun yanlış okunması anlamsız proteinlerin oluşmasına neden olur.

Streptomisin grubu: Tüberküloz tedavisinde kullanılır. Penisilin ile kombinasyon halinde enterokokal endokardit tedavisinde kullanılmaktayken son zamanlarda yerine gentamisin kullanılmaya başlanmıştır.

Neomisin grubu: En toksik aminoglikozidlerdir. Spesifik olmayan aminoglikozid direncine neden oldukları için çok az kullanılmaktadırlar. Paromomisin , ampipli dizanteride yaygın olmamakla birlikte kullanılmaktadır.

Kanamisin grubu: Kanamisin A, etki spektrumu bakımından streptomisine yakındır. P.aeruginosa'ya ve bir çok Enterobacteriaceae türüne karşı daha aktif olan gentamisin ve tobramisin, kanamisinin yerini almışlardır. Tobramisin ise daha az nefrotoksik ve P.aeruginosa'ya karşı biraz daha aktif olarak bulunmuştur. Sisomisin ve dibekasinin gentamisin ve tobramisin üzerine avantajları yok sayılacak kadar azdır. Netilmisinin daha az toksik olduğu ve aminoglikozid modifiye eden enzimlere daha dayanıklı olduğu iddia edilmiştir. Kanamisin A'nın yarı-sentetik bir türevi olan amikasin ile yapılan tedavide, gentamisin ve tobramisine oranla daha yüksek serum seviyelerine ulaşılmıştır. Gentamisin direncine rastlanılan durumlarda amikasin kullanılabilir (24).

Aminoglikozidlerin enterokoklara karşı MİK değerleri şöyledir: Streptomisinin, enterokoklar için ortalama MİK değeri 250 mg/l iken gentamisinin MİK değeri 8-64 mg/l arasındadır (44). Yüksek düzeyde aminoglikozid direnci gentamisin için 500-2000 mg/l, streptomisin için ise 2000 mg/l seviyesinde tespit edilen dirençtir. Bu tür suşlarda beta-laktam antibiyotiklerle aminoglikozid antibiyotiklerin ikili kombinasyonlarında sinerjistik etki görülmemektedir (46).

ENTEROKOKLARDA ANTİBİYOTİKLERE KARŞI OLUŞAN DİRENÇ

Enterokokların çeşitli antibiyotiklere direnç mekanizmaları iki grupta incelenebilir:

1. İntrinsik direnç
2. Kazanılan direnç

1. İntrinsik direnç

İntrinsik direnç, penisilinlere, klindamisine, sefalosporinlere ve düşük düzeyde olmak üzere aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı kalıtsal olarak enterokok suşlarında bulunan dirençtir.

A) Beta-laktam grubu antibiyotiklere intrinsik direnç

Enterokokların , beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç göstermeleri karakteristik özellikleridir. Bu tip direnç enterokok PBP (penisilin bağlayan protein)'lerinin beta-laktam antibiyotikler için kalıtsal olarak düşük afiniteye sahip olmalarından meydana gelmektedir. Solomon adalarından izole edilen ve daha önce antibiyotiklerle karşılaşmamış enterokok suşlarında bile bu özellik görülmüştür (44). Penisilinlere yüksek düzeyde dirençli bir E.faecalis suşunun PBP 5'i sentez etme yeteneğini kaybetmesi bu suşun sadece penisilinlere değil, sefaloridin, sefaleksim ve seftazidime de duyarlı hale gelmesini sağlamıştır (30).

İn - vitro testlerde E.faecalis için penisilin ortalama MİK değeri 2- 8 mg/l arasındadır. Bu değer bir çok streptokok için olan ortalama MİK değerinden 10-100 kat daha büyüktür. E.faecium suşları E.faecalis suşlarına oranla penisiline daha dirençli bulunmakta, ortalama MİK değerleri 16-32 mg/l arasında değişmektedir. Ampisilin E.faecalis için MİK değeri 1-4 mg/l arasındadır ve penisilin için olan MİK değerinden 1 dilüsyon daha aşağıdadır. Yarı-sentetik ve penisilinaza dirençli beta-laktamlara da direnç oldukça yüksek bulunmuştur. Enterokoklar bütün beta-laktam antibiyotiklere tolerandırlar. Bu antibiyotikler enterokoklara bakterisidal değil bakteriyostatik etki gösterirler (44).

B) Aminoglikozid grubu antibiyotiklere intrinsik direnç

Enterokokların aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı az duyarlı bulunmalarının nedeni enterokok bakteri duvarının bu antibiyotiklere karşı geçirgenliğinin az olmasıdır (64).

E.faecalis için streptomisin ve kanamisin ortalama MİK değeri 250 mg/l dolayında, gentamisin ve tobramisin için ise 8-64 mg/l arasındadır. Enterokok suşlarının düşük

düzyeyde 6'-asetil transferaz enzimini Ürettikleri tespit edilmiştir. Kromozomda kodlanan bu enzim düşük düzeyde aminoglikozid direncine neden olmakta ve diğer enterokoklara transfer edilememektedir (44).

Enterokok suşlarında ayrıca klindamisine ve linkomisine karşı da intrinsik bir direnç bulunmaktadır (44).

2. Kazanılan direnç

Kazanılan direnç, beta-laktam antibiyotiklere karşı beta-laktamaz üretimi vasıtasıyla veya beta-laktamaz üretimi olmaksızın, aminoglikozidlere karşı da aminoglikozidleri modifiye eden enzimler vasıtasıyla veya ribozomlardaki mutasyonlar sonucu oluşur. Kazanılan dirence vankomisin varlığında indüklenen vankomisin direncini de ekleyebiliriz.

A) Beta-laktam antibiyotiklere, beta-laktamaz üretimi olmaksızın kazanılan direnç

Enterokok suşlarının beta-laktamaz oluşturarak penisilinlere direnç geliştirdiklerini gösteren çalışmalara karşın, enterokoklarda penisilin direncinin gelişmesinin temel yolu olarak PBP'lerde oluşan modifikasyonlar kabul edilmektedir. E.hirae ile yapılan çalışmalarda penisilin yüksek konsantrasyonlarına maruz bırakılarak elde edilen dirençli mutant suşlarda PBP 5'in miktarı, direncin düzeyi ile doğru orantılı olarak artmıştır. PBP 5'in sentezi ile ilgili pbp 5 geninin yakınında bulunan ve PBP 5 sentezini negatif olarak kontrol eden 1 kb'lık bir DNA kısmının delesyonu, negatif kontrolün kaybolmasıyla PBP 5'in çok fazla sentezine ve bakterinin penisiline yüksek düzeyde dirençli olmasına yol açmaktadır. pbp 5 genindeki nokta mutasyonları PBP 5 sentezinin erken sonlanmasına ve penisiline çok duyarlı mutantların oluşmasına neden olmaktadır. E.hirae'nin pbp 5 geni diğer enterokok türleri ile hibrid oluşturmamakta, bu da penisilinlere afinitesi az olan PBP'lerin, E.hirae ve diğer enterokoklarda farklı olduğunu göstermektedir. Ancak E.hirae'nin PBP 5'ine karşı hazırlanan antikorların E.faecalis'in ve E.faecium'un penisilinlere afinitesi düşük olan PBP'leri

ile reaksiyon vermesi bu proteinler arasında yapısal bir homoloji olduğunu göstermektedir. Düşük afiniteli PBP'lerin çok fazla üretimi ile penisilin direncinin gelişimi arasındaki ilişki diğer enterokok türleri olan *E.faecium*, *E.faecalis*, *E.durans*'ta da gösterilmiştir. Bazı yüksek düzeyde ampisiline dirençli suşlarda ise artan ampisilin direnci düşük afiniteli PBP'ler ile doğru orantılı olarak bulunmamıştır. Bu durum başka mekanizmaların da olabileceğini düşündürmektedir (16).

Solomon adalarından izole edilmiş ve daha önce antibiyotiklerle teması olmamış, penisiline çok duyarlı *E.faecium* suşlarında PBP 5 yerine PBP 5' bulunmuştur. Bu PBP 5' penisiline karşı çok duyarlıdır (23).

Beta-laktamaz üretmeyen ve ampisiline dirençli suşların büyük çoğunluğu *E.faecalis* suşlarıdır. Oster ve arkadaşları (48), 1990 yılında yaptıkları bir çalışmada izole ettikleri enterokok suşlarının % 9'unu ampisiline dirençli olarak bulmuşlar ve bu direnci PBP'lerde afinite azalmasına bağlamışlardır.

Ampisilin ve penisilin beta-laktamaz oluşturmadan bu antibiyotiklere direnç kazanan enterokok suşları için MİK değerleri 25 - \geq 100 mg/l arasında saptanmıştır (44).

B) Beta-laktam antibiyotiklere beta-laktamaz enzimi ile kazanılan direnç

İntrinsik direnç ve PBP'lerde azalan afinite ile direnç kazanmanın yanında, enterokoklar beta-laktamaz üretmek yoluyla da penisilin ve ampisilinleri inaktive etme yeteneğini kazanmışlardır (41).

Enterokok beta-laktamazları penisilin, ampisilin, piperasilin ve diğer üreidopenisilinleri hidrolize edebilmektedirler. Penisilinaza dirençli yarı-sentetik penisilinlere, sefalosporinlere ve imipeneme karşı etkisiz veya az etkilidirler (44).

1983 yılında beta-laktamaz üreten ilk *E.faecalis* suşu izole edilmiştir (51). 1992 yılında ise beta-laktamaz üreten

ve aminoglikozidlere dirençli olan ilk *E.faecium* suşu bildirilmiştir. Bu suşta tespit edilen beta-laktamaz plazmidde kodlanmaktadır ve diğer enterokoklara yüksek oranda geçirilebilmiştir (6). Enterokoklar beta-laktamaz üretme yeteneğini son 50 yıldır bu özelliğe sahip stafilokoklardan almış olmalıdırlar (72).

Patterson ve arkadaşları (49) beta-laktamaz kodladığı bildirilen ilk 6 enterokok suşunda plazmidleri genetik yönden incelemişler ve stafilokoklardan elde edilen beta-laktamaz geninin probuyla enterokok plazmidlerini hibridize etmişlerdir. Bu ve buna benzer çalışmalar *E.faecalis*'te bulunan beta-laktamaz genleri ile stafilokoklarda bulunan beta-laktamaz genlerinin ortak bir genden orijin almış olabilecekleri düşüncesini akıllara getirmektedir. *E.faecalis*'in beta-laktamazları plazmid kaynaklıdır, konstitütif olarak sentezlenirler ve hücreye bağlı olarak bulunurlar. *S.aureus*'ta ise beta-laktamaz genleri indüklenebilir genlerdir ve oluşturdukları beta-laktamazlar ortama salınırlar (55). Smith ve arkadaşları (55) *E.faecalis*'te repressör bir proteinin olmamasının beta-laktamaz enziminin konstitütif olarak üretilmesine yol açtığını belirlemişlerdir. Kromozomda bulunan beta-laktamaz genlerinin diğer enterokoklara transferi, beta-laktam direnciyle birlikte çoğu zaman streptomisin, eritromisin, gentamisin ve tetrasiklin direnç genlerinin de aktarımına yol açmaktadır. Bu tip direnç başka suşlara düşük oranda aktarılabilir. Plazmidde kodlanan beta-laktamaz genleri ise başka suşlara yüksek oranlarda aktarılabilir (50).

Markowitz ve arkadaşları (40), 1991 yılında, *E.faecalis* suşlarında görülen beta-laktamaz üretiminin ve aminoglikozid direncinin 60-65 MDa'luk bir plazmidle ilgili olduğunu saptamışlardır. Bu plazmid, plazmid taşımayan enterokok suşlarına kolaylıkla transfer edilebilmiştir.

C) Vankomisin direnci

Bir glikopeptid olan vankomisin 30 yıldan beri kullanıma masına rağmen enterokoklarda glikopeptid direncine çok seyrek rastlanmıştır. Glikopeptidlere karşı dirençli ilk suş 1986 yılında Fransa'da izole edilmiştir (7).

Enterokoklarda Uç tip vankomisin direnci bulunmaktadır.

a) Van A tipi direnç: Vankomisinin MİK değeri 256 mg/l' den büyüktür, teikoplanine de direnç vardır. Konjugasyonla aktarılabilir.

b) Van B tipi direnç: Vankomisinin MİK değeri 32-256 mg/l arasındadır. Teikoplanine direnç yoktur. Konjugasyonla aktarılamamıştır.

c) Van C tipi direnç: Düşük seviyede vankomisin direnci bulunmaktadır. MİK değeri 16 mg/l'dir ve E.gallinarum' da bulunmuştur (27).

1991 yılından itibaren vankomisine yüksek düzeyde dirençli fakat teikoplanine duyarlı olan E.faecalis ve E.faecium suşları izole edilmeye başlanmıştır. Bu tip suşlar Van American olarak adlandırılmışlardır (19).

Van A tipi dirençten 39 kDa ağırlığında bir membran proteini sorumluyken, Van B tipi dirençten 39.5 kDa ağırlığında başka bir membran proteini sorumludur. Van A tipindeki dirençte indükleyici olarak vankomisin mutlaka bulunmalıdır. Bu indüklenebilen direnç plazmid yoluyla diğer enterokoklara aktarılabilir. Van B direncinden sorumlu gen kromozom üzerindedir ve konjugasyonla aktarılamaz. Van C tipi direnç indüklenemeyen ve aktarılamayan bir direnç tipidir (64).

D) Aminoglikozid grubu antibiyotiklere yüksek düzeyde direnç

a) Streptomisine karşı yüksek düzeyde aminoglikozid direnci: Enterokoklar için streptomisinin MİK değeri 2000 mg/l' den daha yüksek olarak veya eşit olarak bulunursa, bir beta-laktam antibiyotikle birlikte sinerjist antibiyotik etkisi elde edilememektedir. Yüksek düzeyde streptomisin direnci iki gruba ayrılabilir:

- I. Enzimatik inaktivasyonla kazanılan direnç
- II. Ribozomal mutasyonla kazanılan direnç

Enzimatik yoldan kazanılan direnç 45 MDa'lık bir plazmid vasıtasıyla aktarılabilir. Bu plazmid amino-

glikozidleri modifiye eden iki enzimi kodlamaktadır. Bu enzimler, streptomisin adenililtransferaz ve neomisin fosfotransferazdır. Streptomisin adenililtransferaz enzimi streptomisinin, 6-hidroksil pozisyonunu adenillemektedir. Streptomisin adenililtransferaza sahip enterokok suşlarına streptomisinin MİK değerleri 4000-16000 mg/l arasında değişir. Bu tip direnç 16000 mg/l gibi çok yüksek antibiyotik konsantrasyonlarıyla yenilebilir (44).

Ribozomal yoldan kazanılan direnç ise çok daha yüksek düzeydedir. 128000 mg/l streptomisin konsantrasyonlarıyla bile yenilememiştir (30).

Bazı enterokok suşlarında, streptomisin ve gentamisin de dahil olmak üzere birçok aminoglikozid antibiyotiğe orta derecede yüksek düzeyde direnç saptanmakta, antibiyotiklerin bu suşlar için MİK değerleri 250-1000 mg/l arasında bulunmaktadır. Bu suşlar, aminoglikozid ve beta-laktam antibiyotiklerin sinerjist etkisine duyarlı kalmaktadırlar. Yüksek düzeyde aminoglikozid direnci araştırılırken bu durum göz önünde bulundurulmalı ve böyle suşlar streptomisine karşı yüksek düzeyde dirençli olarak kabul edilmelidirler (2).

Bartoloni ve arkadaşları (3), 1990-1991 yılları arasında hemokültürlerden izole ettikleri yüksek düzeyde streptomisin dirençli enterokok suşlarının oranını %47.8 olarak bulmuşlardır. **Gray** ve arkadaşları (22), hemokültürlerden izole ettikleri *E.faecalis* suşlarının %7.7'sini, *E.faecium* suşlarının ise %10.5 kadarını streptomisine yüksek düzeyde dirençli olarak bulmuşlardır.

b) Gentamisine karşı yüksek düzeyde aminoglikozid direnci: Gentamisine yüksek düzeyde dirençli enterokok suşları ilk olarak 1979 yılında Paris'te izole edilmiştir. O tarihten sonra bazı merkezlerde enterokok suşlarının %50'den fazlası gentamisine yüksek düzeyde dirençli olarak bulunmuştur. Yüksek düzeyde gentamisin direncine sahip enterokok suşlarının bazıları, 2' fosfotransferaz (2'APH) ve 6' asetiltransferaz

(6' AAC) aktivitelere sahip bifonksiyonel bir enzime sahiptirler. Bu enzim gentamisine dirençli stafilokoklarda bulunan enzime eş bir enzimdir (41).

Enterokok suşlarında bulunan yüksek düzeyde gentamisin direnci konjugatif veya non-konjugatif plazmidlerde kodlanabilir (33).

Bifonksiyonel 6' AAC-2' APH' enzimi, E. faecalis, E. faecium, S. aureus ve koagülaz negatif stafilokoklarda bulunmuştur. Bu durum gentamisin direnci için ortak bir orijinin bulunduğunu ve bu türler arasında gen alışverişini düşündürmektedir. E. faecalis'te bulunan Tn5281 transpozonu stafilokoklarda bulunan Tn4001 ve Tn4031 transpozonları ile benzerlikler göstermektedir (33).

Gentamisine yüksek düzeyde direnç gösteren E. faecalis suşlarının büyük çoğunluğu diğer aminoglikozidlere de direnç göstermektedirler. Gentamisine yüksek düzeyde dirençli olup streptomisine yüksek düzeyde dirençli olmayan suşlar da son zamanlarda artan oranlarda izole edilmeye başlanmıştır (%49) (58).

Gentamisine yüksek düzeyde dirençli olan suşlar beta-laktamaz da üretebilmektedirler. Enterokoklarda direnç determinantlarının aktarımı birçok farklı yolla olabilmektedir. En yaygın konjugasyon yoluyla olan aktarımdır. İki hücre arasında feromon yoluyla kolaylaşan bir temas sağlanır ve genetik bilginin plazmidler yoluyla aktarımı gerçekleşebilir (50).

1985-1988 yılları arasında hemokültürlerden izole edilen yüksek düzeyde gentamisin dirençli suşların oranı %9 iken, 1989-1991 yılları arasında %35'e yükselmiştir (65).

Woodford ve arkadaşları (68) gentamisine yüksek düzeyde direnç gösteren *E.faecium* suşlarında 50 MDa'luk bir plazmidin bu dirençle ilgili olduğunu bulmuşlardır. Bu direnç konjugasyon yolu ile aktarılabilmiştir.

Trimetoprim direnciyle gentamisin direncinin aynı plazmid üzerinde bulunması, trimetoprim kullanımının seçici baskı oluşturarak, direnç plazmidlerinin enterokok populasyonları arasında yayılmasını kolaylaştırdığını düşündürmektedir (69).

Ülkemizde **Hasçelik** ve arkadaşları (28) *E.faecalis* suşlarının % 28.6'sını gentamisine orta, % 23.8'ini ise yüksek düzeyde dirençli olarak bulmuşlardır.

Töreci ve **Öngen** (63)'in. yaptığı çalışmada 100 enterokok suşunun % 87'si *E.faecalis*, % 13 'ü *E.faecium* olarak tanımlanmış, 2. suşta penisilinlere, 5 suşta penisilin ve aminoglikozidlerin bir veya daha fazlasına, 17 suşta da yalnız aminoglikozidlerin bir ya da daha fazlasına yüksek düzeyde direnç saptanmıştır.

ANTİBİYOTİKLERİN sub-MİK KONSANTRASYONLARININ BAKTERİLER ÜZERİNE ETKİSİ

Antibiyotiklerin düşük konsantrasyonları, bakterilerin morfolojilerini, üreme özelliklerini ve virulanslarını değiştirebilmektedir. Özellikle beta-laktam antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarına maruz bırakılan Gram pozitif koklar genişlemekte, Gram negatif çomaklar ise uzun filamanlar oluşturmaktadır (36).

Bakteriyel infeksiyon hastalıklarının tedavisinde hangi antibiyotiğin etkili olacağını belirleyen testler, minimal inhibitör konsantrasyonunun (MİK) saptanmasına dayanır. Antibiyotiğin etkili olması için serumdaki ve infeksiyon bölgesindeki konsantrasyonunun MİK'ten büyük olması istenir. Halbuki sub-MİK değerlerin (sub-minimal inhibitör konsantrasyonun) de bakterilerin üremesine, morfolojisine, fagositozuna, serum ile lizisine, virulansına,

hücre yüzeylerine yapışmasına, enzim ve toksin oluşturmaya etkili olduğu çeşitli modellerle gösterilmiştir (62).

Bakteri üremesini ve/veya morfolojisini etkileyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MAK (minimal antibiyotik konsantrasyonu) olarak tanımlanır. MİK/MAK oranının büyük olması, antibiyotiğin etkili olduğu konsantrasyon sınırlarının genişliğini gösterir. En yüksek oran *P.mirabilis* ve tobramisin arasında, en düşük oran ise *E.faecalis* ve beta-laktam grubu antibiyotikler arasında bulunmuştur. Ampisilin, sefalotin, gentamisin ve amikasinin *E.coli* suşları üzerine MAK değerleri incelendiği zaman ampisilin en geniş aktivite sınırına sahip olduğu görülmüştür. Gentamisin ve amikasin birbirlerine yakın ve geniş bir aktivite sınırına sahip olarak görülmüşlerdir (62,71).

Abraham 1949 yılında antibiyotiklerin sub-MİK etkilerinin üç çeşit olduğunu bildirmiştir:

1. Bakteri üremesinde gizli dönemin uzaması,
2. Logaritmik üreme fazında üreme hızının azalması,
3. Stasyoner faza ulaşan bakteri popülasyonunun yoğunluğunda azalma.

Bir antibiyotikle bu etkilerin hepsi veya bir tanesi gözlenebilir (52).

Penisilinler, çok düşük konsantrasyonlarda bile hücre bölünmesini ve septum oluşturucu sistemi inhibe edebilmektedirler (37). *P.mirabilis*, ampisilin sub-MİK konsantrasyonlarında uzun filamentöz cisimler oluşturur. Düşük dozda beta-laktam antibiyotikler ile tedavi edilen hastaların idrarlarında *Enterobacteriaceae* türleri, filamentöz şekiller meydana getirirken, Gram pozitif kokların geniş, bir veya daha fazla kalın duvarlı hücreler oluşturduğu gözlenmiştir (36).

E.faecalis suşları, 1/4 MİK penisilin konsantrasyonuna 4 saat maruz bırakıldıkları zaman, 3-4 kat büyümektedirler. Her kitlede birbirine bağlı 4-8 adet hücre görülmektedir (37).

Antibiyotik sonrası etki (ASE)'de sub-MİK'daki antibiyotiğin ortamda bulunmasının da bir yap sahibi olacağı düşünülmüştür.

Bu nedenle beta-laktam antibiyotiklerle ASE çalışmaları yapılırken sulandırma ile değil, beta-laktamaz ilavesi ile antibiyotiğin inaktive edilmesi tercih edilir. İn-vivo çalışmalarda da, özellikle serumda uzun yarılanma ömrüne sahip antibiyotiklerle çalışırken sub-MİK'da antibiyotiğin etkisi dikkate alınmalıdır (4). Antibiyotik sonrası etkide sub-MİK'un etkisi ASE-SME olarak adlandırılmıştır.

ASE'de bulunan bir bakteri düşük konsantrasyonda antibiyotiğe maruz bırakılırsa üremenin çok uzun süre engellendiği bir periyod elde edilir. Ayrıca mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte MİK'un çok üzerindeki konsantrasyonlarda (supra-MİK) bir antibiyotik dozuna kısa bir süre de olsa maruz bırakılan bakterilerde hücre duvarı zedelenmekte ve daha sonra üremenin inhibisyonu için çok az bir antibiyotik konsantrasyonu bile yeterli olmaktadır (4).

Beta-laktam grubu antibiyotikler ile yapılan çalışmalar sonucunda antibiyotik sonrası sub-MİK etkisinin, sadece sub-MİK etkiden belirgin bir şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür (38).

Bu çalışmada, penisilin G, ampisilin, gentamisin ve streptomisin minimal inhibitör konsantrasyonunun altında ve üstündeki antibiyotik konsantrasyonlarına maruz bırakılan E.faecalis suşlarında, direncin gelişip gelişmediği araştırılmıştır. Sub-MİK konsantrasyonlarda direnç geliştirme çalışması yapılırken, antibiyotiklerin 1/2 MİK ve 1/4 MİK'ları, supra-MİK konsantrasyonlarla çalışırken 5 MİK'ları kullanılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

I. GEREÇLER

Bakteriler

Deneylerde, Anabilim Dalımızda izole edilen 20 Enterococcus faecalis suşu kullanılmıştır.

Antibiyotikler

Penisilin G (aktivitesi 910.8 mg/g), ampisilin (aktivitesi 880.3 mg/g), streptomisin (aktivitesi 756 mg/g) ve gentamisin (aktivitesi 645 mg/g) kullanılmış, bu antibiyotikler İbrahim Abdi İlaç Şirketinden sağlanmıştır. Konsantre antibiyotik çözeltileri steril distile su kullanılarak, daha sonraki sulandırılmalar besiyerinin yapısını değiştirmemek için Mueller-Hinton buyyonunda hazırlanmıştır.

Besiyerleri

Mueller -Hinton (Oxoid) buyyon ve agarı kullanılmıştır.

Kullanılan araç ve aygıtlar

Anabilim Dalında bulunan hassas terazi (Mettler H 72), su banyosu (0°-120° C, Elektro-mag), otomatik pipetler (05-10 µl, 40-200 µl, 200-1000 µl, Nichiryo model 5000) ve pipet uçları, cam pipetler (1 ml, 5 ml, 10 ml), steril Petri kutuları (9cm ø), cam balonlar, cam tüpler (16 mm ø), McFarland bulanıklık tüpleri, spektrofotometre (Pharmacia LKP-Ultraspac II), etüv (0°-70°C, Dedeoğlu), buzdolabı (0-4°C, Arçelik), otoklav (0-4 bar, Kermanlar), Vortex (Janke-Kunkel İKA-Labortechnik) ve gerekli diğer cihazlar kullanılmıştır.

II. YÖNTEMLER

Minimal inhibitör konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

Kullanılan 4 antibiyotiğin E.faecalis suşlarına MİK değerleri agarda dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Bunun için besiyerinin ml'sinde bulunması istenen antibiyotik miktarının 10 katı konsantrasyonda antibiyotik çözeltisi hazırlanmış, bu çözeltilerden 2 ml steril Petri kutusuna konmuş ve üzerine otoklavda 121°C'de 15 dakika bekletilerek sterilize edilen, su banyosunda 48-50°C'ye kadar soğutulan Mueller-Hinton agardan 18 ml ilave edilmiş ve antibiyotik çözeltisi ile iyice karışması sağlanmıştır. Bu şekilde antibiyotik çözeltisinin besiyerinde 10 defa sulandırılması ile istenilen konsantrasyon elde edilmiştir. Besiyeri donduktan sonra sıkıca kapalı plastik torbalarda buzdolabına (+4°C) kaldırılmış ve 5 gün içinde kullanılmıştır.

Denenecek suşların Mueller-Hinton agarındaki bir gecelik kültürlerinden Mueller-Hinton buyyonda McFarland 0.5 tüpü bulanıklığında süspansiyonları hazırlanmış ($\sim 10^8$ cfu/ml), bu süspansiyon da aynı besiyerinde 100 defa sulandırıldıktan sonra belirli konsantrasyonda antibiyotik içeren Petri kutularındaki Mueller-Hinton agarda işaretlenmiş bölgeye 0.01 ml ($\sim 10^4$ cfu/ml) damlatılmıştır. Bir Petri kutusunda en çok 10 suş denenmiştir. Her suşun üremediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu o suş için MİK olarak saptanmıştır.

Sub-MİK antibiyotik konsantrasyonlarında direnç gelişiminin aranması

Kullanılan 4 antibiyotiğin her biri için aynı MİK'ların elde edildiği 10 suş seçilmiştir. Bu suşların Mueller-Hinton agarındaki bir gecelik kültürlerinden Mueller-Hinton buyyonunda McFarland 0.5 tüpü bulanıklığında süspansiyonları hazırlanmış, bu süspansiyon da aynı besiyerinde 100 defa sulandırılmış ($\sim 10^6$ cfu/ml) ve deney tüplerine 1 ml olarak dağıtılmış, bu bakteri süspansiyonlarına ml'de 1 MİK veya 1/2 MİK

antibiyotik içeren Mueller-Hinton buyyonundan 1 ml konmuş, bu şekilde ml'de 5×10^5 cfu bakteri ve 1/2 veya 1/4 MİK antibiyotik içeren tüpler elde edilmiştir. Bu tüpler 37°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra Mueller-Hinton agarda dilüsyonla MİK'lar tekrar belirlenmiştir.

Ertesi gün MİK değerinde bir değişme olmamışsa 1/2 MİK antibiyotik içeren agardan elde edilen bakteri süspansiyonu ile 2. pasaj deneyi aynı şekilde yapılmış, MİK değerinde artış olmuşsa en yüksek antibiyotik konsantrasyonu içeren agardan alınan bakterilerle yeni saptanan MİK değerinin 1/2 veya 1/4'ünü içeren buyyonda süspanse edilen bakterilerle deneye devam edilmiştir. Deneyler hem 1/2 MİK, hem de 1/4 MİK antibiyotik konsantrasyonlarında 10 defa pasaj yapılan kadar sürdürülmüştür. Her pasajda en yüksek antibiyotik konsantrasyonunda üreyen bakteriler katı besiyerine azaltma yöntemi ile ekilerek kültürün saf olarak devam ettiği (kontaminasyon olmadığı) kontrol edilmiş, ayrıca tek dilüsyonluk farklar sulandırma farklılıkları ve deney koşullarından da olabilir düşüncesi ile antibiyotikle temas etmemiş başlangıç kültürleri için de MİK değerleri tekrar belirlenmiş, gerektiğinde deneyin tekrarı ile MİK değerlerinin farklılaşması doğrulanmıştır.

5 MİK antibiyotik konsantrasyonuna maruz bırakılmada direnç gelişiminin aranması

Suşların Mueller-Hinton buyyonundaki bir gecelik kültürleri aynı besiyerinde 100 defa sulandırılmış ve 37°C'de, birer saatlik aralarla 660 A° dalga boyunda 0.200 absorbans ölçülene kadar (1×10^8 - 2×10^8 cfu/ml) üretilmiştir. İstenilen bakteri konsantrasyonuna erişilen 9 ml buyyon kültürüne ml'de MİK'un 50 katı antibiyotik içeren çözeltiden 1 ml ilave edilerek tüpte ml'de MİK'un 5 katı antibiyotik bulunması sağlanmıştır. Bakteri 5 MİK antibiyotik konsantrasyonunda 7.5 saat 37°C'de bekletildikten sonra antibiyotiksiz 9.9 ml buyyona 0.1 ml olarak pasaj yapılmış ve ertesi güne kadar (~16 saat) üremesi sağlanmıştır. Bu işleme aynı şekilde 5 gün devam edilerek bakterinin 5 defa 7.5'ar saat süre

ile 5 MİK'da antibiyotik şokuna maruz kalması sağlanmış ve sonra agarda dilüsyon yöntemi ile MİK değerlerinde değişme olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bu deneylerde de kültürlerin saflık kontrolleri ve yeni MİK değerlerinin antibiyotikle temas etmemiş kültür ile paralel kontrolü yapılmıştır.



BULGULAR

Çalışmaya idrar kültürü yapılması için çocuk hastalardan gönderilen çeşitli idrar örneklerinden laboratuvarımızda izole edilen, kısa veya uzun zincir oluşturan, Gram pozitif kok morfolojisinde olan, negatif oksidaz ve katalaz deneyleri veren, % 6.5 tuzlu besiyerinde ve % 40 safralı besiyerinde üreyen, eksülini hidrolize eden, arabinozu fermente etmeyen 20 Enterococcus faecalis suşu ile başlanmış; suşların identifikasyonu API 20 Strep (bioMérieux) kiti ile de doğrulanmıştır.

20 suş için penisilin G, ampisilin, gentamisin ve streptomisinin agar dilüsyon yöntemi ile saptanan MİK değerleri **tablo 1'**de gösterilmiştir.

Bu suşlardan kullanılan 4 antibiyotiğin aynı MİK değerlerine sahip 10'u (No: 10, 12, 13, 70, 72, 74, 78, 95, 97, 98) direnç geliştirme çalışmalarında kullanılmıştır. Bu suşların hepsi için penisilin G 3.125 mg/l, ampisilin 1.56 mg/l, gentamisin 25 mg/l, streptomisin 250 mg/l MİK değerleri vermişlerdir.

Suşlar, penisilin G'nin 0.78 mg/l (1/4 MİK) veya 1.56 mg/l (1/2 MİK) konsantrasyonlarında üretilip, agar dilüsyon yöntemi ile penisilin G'nin MİK değerleri tekrar belirlendiğinde 10.pasajda da MİK değerlerinde bir değişiklik olmamış, suşlar 1.56 mg/l penisilin G konsantrasyonunda üremiş daha yüksek konsantrasyonlarda ürememiştir (**Tablo 2**).

Tablo 1. Kullanılan 4 antibiyotiğin 20 E.faecalis suşu için saptanan MİK değerleri (mg/l).

Suş no:	Penisilin G	Ampisilin	Gentamisin	Streptomisin
1	100	1.56	25	500
5 ^k	1.56	1.56	50	1000
8	6.25	1.56	25	500
10*	3.125	1.56	25	250
12*	3.125	1.56	25	250
13*	3.125	1.56	25	250
16	6.25	1.56	50	1000
61	3.125	1.56	25	1000
67	12.5	6.25	50	1000
68	1.56	1.56	50	1000
70*	3.125	1.56	25	250
71	6.25	3.125	50	1000
72*	3.125	1.56	25	250
74*	3.125	1.56	25	250
75	3.125	3.125	25	500
78*	3.125	1.56	25	250
95*	3.125	1.56	25	250
97*	3.125	1.56	25	250
98*	3.125	1.56	25	250
100	100	50	100	2000

* Direnç geliştirme çalışmalarında kullanılan 10 suş

Tablo 2. Penisilin G'nin 1/4 MİK ve 1/2 MİK 'larında pasajı yapılan suşlarda üreme.

Pasaj sayısı	Suş numaraları	Penisilin G konsantrasyonu (mg/l)		
		6.25	3.125	1.56
1-10	10 suşun tamamı	-	-	+

Suşlar ampisilinin 0.39 mg/l (1/4 MİK) veya 0.78 mg/l (1/2 MİK) konsantrasyonlarında üretilip agar dilüsyon yöntemi ile ampisilinin MİK değerleri tekrar belirlendiğinde ilk 2 pasajda bir değişme saptanmamış, 1/4 MİK veya 1/2 MİK'larda 3. defa pasajı yapılan suşların hepsi için ise MİK değerlerinin 1 tüp ilerlediği, 3.125 mg/l olduğu saptanmıştır. Suşların daha sonra yeni MİK değerlerinin 1/4'ünde (0.78 mg/l) veya yarısında (1.56 mg/l) pasajları yapıldığında 10. pasaj dahil bir değişme olmamış, 1.56 mg/l ampisilin konsantrasyonunda üreyen suşların hiçbirisi 3.125 mg/l konsantrasyonunda ürememiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Ampisilinin 1/4 ve 1/2 MİK'larında pasajı yapılan suşlarda üreme.

Pasaj sayısı	Suş numaraları	Ampisilin konsantrasyonu (mg/l)			
		6.25	3.125	1.56	0.78
1. - 2.	10 suşun tamamı	-	-	-	+
3. -10.	10 suşun tamamı	-	-	+	+

Suşlar gentamisininin 6.25 mg/l (1/4 MİK) konsantrasyonunda üretilip her pasajda agar dilüsyon yöntemi ile gentamisininin MİK değerleri tekrar belirlendiğinde, 1. pasajda 7 suş için (No:12,13,72,74,78,95,97) MİK değerlerinin 1 kat artarak 50 mg/l olduğu; 2.pasajda 1 suş için (No:70) 2 kat artarak, 6 suş için (No:12,72,74,78,95,97) 1 kat daha artarak 100 mg/l'yi bulduğu, 1 suş için (No:13) 50 mg/l'de, 2 suş için (No:10,98), 25 mg/l'de devam ettiği; 3. pasaj sonunda 2 suşta (No:10,98) ilk defa 1 dilüsyon artış olduğu, diğerlerinde bir değişme olmadığı; 4.pasajda önceki pasaja göre 1 suşta (No:13) 1 dilüsyon arttığı; 5.pasajda önceki pasajlarda alınan sonuçların alındığı; 6.pasajda 1 suşta (No:10) MİK değerinin 1 dilüsyon yükseldiği; 7.pasajda aynı değerlerin muhafaza edildiği; 8.pasajda 1 suş için (No:98) MİK değerinin diğerleri gibi 100 mg/l'yi

bulduğu; 9.pasajda 7 suş için (No: 10,70,72,74,78,95,97) MİK değerlerinin 200 mg/l'ye yükseldiği ve 10. pasajda bir değişikliğin olmadığı saptanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. Gentamisinin 1/4 MİK'unda pasajı yapılan suşlarda üreme.

Pasaj sayısı	Suş numarası	Gentamisin konsantrasyonu (mg/l)				
		200	100	50	25	12.5
1.	10,70,98	-	-	-	-	+
	12,13,72,74,78,95,97	-	-	-	+	+
2.	10,98	-	-	-	-	+
	13	-	-	-	+	+
	12,70,72,74,78,95,97	-	-	+	+	+
3.	10,13,98	-	-	-	+	+
	12,70,72,74,78,95,97	-	-	+	+	+
4.ve.5.	10,98	-	-	-	+	+
	12,13,70,72,74,78,95,97	-	-	+	+	+
6.ve 7.	98	-	-	-	+	+
	10,12,13,70,72,74,78,95,97	-	-	+	+	+
8.	Suşların tamamı	-	-	+	+	+
9.ve 10.	12,13,98	-	-	+	+	+
	10,70,72,74,78,95,97	-	+	+	+	+

Suşlar gentamisinin 12.5 mg/l (1/2 MİK) konsantrasyonunda üretilip, her pasajda agar dilüsyon yöntemi ile gentamisinin MİK değerleri tekrar belirlendiğinde, 1.pasajda 8 suş için (No:12,13,70,72,74,78,95,97) MİK değerlerinin 1 kat artarak 50 mg/l olduğu; 2.pasajda 7 suş için (No:12,70,72,74,78,95,97) MİK değerlerinin 1 kat daha artarak 100 mg/l'yi bulduğu, 1 suş için (No:13) 50 mg/l'de, 2. suş için (No:10,98) 25 mg/l' de devam ettiği; 3.pasajda 2 suş için (No:10,98) ilk defa

1 dilüsyon artışın görüldüğü, diğerlerinde bir değişikliğin olmadığı; 4.pasajda önceki pasajlara göre 2 suş için (No:13,98) 1 dilüsyon artışla MİK değerlerinin 100 mg/l olduğu; 5.pasajda sadece 1 suş için (No:78) MİK değerinin 1 dilüsyon yükseldiği; 6.pasajda önceki pasajda alınan sonuçların değişmediği; 7.pasajda sadece 1 suş için (No:10) 1 dilüsyon artışla MİK değerinin 100 mg/l'ye yükseldiği; 8. pasajda önceki pasajda alınan sonuçların değişmediği; 9. pasajda 8 suş için (No:10, 12,13,70,72,74,95,97) MİK değerlerinin 1 dilüsyon artış gösterdiği ; 10.pasajda 2 suş için (No:74,78) MİK değerlerinin 1 dilüsyon artış göstererek 400 mg/l'ye yükseldiği saptanmıştır (Tablo 5).

Suşlar streptomisin 62.5 mg/l (1/4 MİK) konsantrasyonunda üretilip her pasajda agar dilüsyon yöntemi ile streptomisin MİK değerleri tekrar belirlendiğinde, 1., 2. ve 3. pasajlardan sonra herhangi bir değişiklik gözlenmezken, 4.pasajda 3 suş için (No:78,95,98) MİK değerlerinin 2 dilüsyon artarak 1000 mg/l'ye yükseldiği; 5.pasajda 1 suş için (No:72) MİK değeri değişmezken, 6 suş için (No:10,12,13,70,74,97) MİK değerlerinin 1 dilüsyon artarak 500 mg/l'ye yükseldiği, 3 suş için de (No:78,95,98) MİK değerlerinin 3 dilüsyon daha artış göstererek 8000 mg/l'ye yükseldiği; 6.pasajda 1 suş için (No:74) MİK değerinin 1 kat artarak 1000 mg/l'ye, 3 suş için (No:78,95,98) MİK değerlerinin 1 dilüsyon artarak 16000 mg/L'ye yükseldiği, 6 suş için de (No:10,12,13,70,72,97) MİK değerlerinin değişmediği; 7. pasajdan sonra 1 suş için (No:72) MİK değeri 1 dilüsyon artışla 500 mg/l olurken, 1 suş için (No:74) 2 dilüsyon artışla 4000 mg/l'ye ulaştığı, diğer suşlar için MİK değerlerinde herhangi yeni bir değişikliğin gözlenmediği; 8.pasajda 1 suş için (No:72) MİK değerinin 1 dilüsyon artış göstererek 1000 mg/l'ye ulaştığı, 1 suş için de (No:74) MİK değerinin 1 dilüsyon artarak 8000 mg/l'ye ulaştığı, 3 suş için (No:78,95,98) MİK değerlerinin 1 dilüsyon daha artarak 32000 mg/l'ye ulaştığı, diğer suşlar için olan MİK değerlerinde bir değişikliğin olmadığı; 9.pasajda 1 suş için (No:72) MİK değerinin 1 dilüsyon artarak 2000 mg/l'ye ulaştığı, 2 suş için (No:12,70) MİK değerlerinin birer dilüsyon

artarak 1000 mg/l'ye yükseldiği, diğer suşların MİK değerlerinde yeni bir değişikliğin gözlenmediği; 10.pasajda sadece 1 suş için (No:74) MİK değerinin 2 dilüsyon artış göstererek 32000 mg/l'ye yükseldiği saptanmıştır (Tablo 6).

Tablo 5. Gentamisin'in 1/2 MİK'unda pasajı yapılan suşlarda üreme.

Pasaj sayısı	Suş numarası	Gentamisin konsantrasyonu (mg/l)					
		400	200	100	50	25	12.5
1.	10,98	-	-	-	-	-	+
	12,13,70,72,74,78,95,97	-	-	-	-	+	+
2.	10,98	-	-	-	-	-	+
	13	-	-	-	-	+	+
	12,70,72,74,78,95,97	-	-	-	+	+	+
3.	10,13,98	-	-	-	-	+	+
	12,70,72,74,78,95,97	-	-	-	+	+	+
4.	10	-	-	-	-	+	+
	12,13,70,72,74,78,95,97,98	-	-	-	+	+	+
5.ve 6.	10	-	-	-	-	+	+
	12,13,70,72,74,95,97,98	-	-	-	+	+	+
	78	-	-	+	+	+	+
7.ve 8.	10,12,13,70,72,74,95,97,98	-	-	-	+	+	+
	78	-	-	+	+	+	+
9.	98	-	-	-	+	+	+
	10,12,13,70,72,74,78,95,97	-	-	+	+	+	+
10.	98	-	-	-	+	+	+
	10,12,13,70,72,95,97	-	-	+	+	+	+
	74,78	-	+	+	+	+	+

Suşlar streptomisinin 125 mg/l (1/2 MİK) konsantrasyonunda üretilip her pasajda agar dilüsyon yöntemi ile streptomisinin MİK değerleri tekrar edildiğinde 1.pasajda 5 suş için (No:13,72,74,95,97) MİK değerlerinin 1 dilüsyon artışla 500 mg/l'ye yükseldiği ; 2. pasajda 3 suş için (No: 12,70,78) daha MİK değerlerinin birer dilüsyon yükselerek 500 mg/l'ye yükseldiği, 2 suş için (No:95,97) birer dilüsyon artarak 1000 mg/l'ye, 1 suş için de (No:10) 2 dilüsyon artarak 1000 mg/l'ye yükseldiği; 3.pasajda 5 suş için (No:12,13,70,72,74) MİK değerlerinin 1 dilüsyon artarak 1000 mg/l'ye 1 suş için (No:10) 1 dilüsyon, diğer 1 suş için (No:78) 2 dilüsyon artış göstererek 2000 mg/l'ye ulaştığı; 4.pasajda MİK değerlerinin 1 suş için (No:98) 2 dilüsyon artarak 1000 mg/l'ye, 4 suş için (No:13,72,74,97) birer dilüsyon artarak 2000 mg/l'ye yükseldiği, 3 suş için (No:12,70,95) ikişer dilüsyon artarak, 2 suş için (No:10,78) birer dilüsyon artarak 4000 mg/l'ye yükseldiği; 5.pasajda 3 suş için (No:13,72,74) MİK değerlerinin birer dilüsyon artış göstererek 4000 mg/l'ye, 5 suş için (No:10,12,70,78,95) ise birer dilüsyon, 1 suş için de (No:97) 2 dilüsyon, diğer 1 suş için de (No:98) 3 dilüsyon artarak 8000 mg/l'ye yükseldiği; 6.pasajda 1 suş için (No:72) MİK değeri değişmezken, 7 suş için (No:10,12,70,78,95,97,98) birer dilüsyon, 2 suş için de (No:13,74) 2 dilüsyon artarak 16000 mg/l'ye yükseldiği; 7 pasajda 1 suş için (No:72) MİK değerinin 1 dilüsyon artarak 8000 mg/l'ye, 9 suş için de (No:10,12,13,70,74,78,95,97,98) birer dilüsyon artarak 32000 mg/l'ye yükseldiği, 8., 9. ve 10. pasajlarda MİK değerlerinde herhangi bir değişikliğin gözlenmediği saptanmıştır (Tablo 7).

Tablo 7. Streptomisinin 1/2 MİK konsantrasyonunda pasaja yapılan suşlarda üreme.

Pasaj sayısı	Suş numarası	Streptomisin konsantrasyonu (mg/l)									
		32000	16000	8000	4000	2000	1000	500	250	125	
1.	10, 12, 70, 78, 98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	13, 72, 74, 95, 97	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2.	98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	12, 13, 70, 72, 74, 78	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	10, 95, 97	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
3.	98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	12, 13, 70, 72, 74, 95, 97	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
	10, 78	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
4.	98	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
	13, 72, 74, 97	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	10, 12, 70, 78, 95	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
5.	13, 72, 74	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
	10, 12, 70, 78, 95, 97, 98	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
6.	72	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
	10, 12, 13, 70, 74, 78, 95, 97, 98	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
7.ve 10.	72	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	10, 12, 13, 70, 74	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	78, 95, 97, 98	-	+	+	+	+	+	+	+	+	

Penisilin G'nin 15.625 mg/l (5 MİK) konsantrasyonuna her gün 7.5 saat temas ettirilip sonra antibiyotiksiz besiyerine ekim yapılarak 1 gece (16 saat kadar) üretilen, bu işleme 5 gün devam edilerek 5 defa antibiyotik şokuna maruz bırakılan suşlar için 5 gün sonunda MİK değerleri tekrar belirlendiğinde 1 suş için (No:10) MİK değerinin 1 dilüsyon artarak 6.25 mg/l oldu-

ğ u, diğ er suş lar için bir değ iş me g örü lmediğ i saptanmı ş tır (Tablo 8).

Tablo 8. Penisilin G'nin 5 MİK'una beş defa maruz bırakılan suş lar için MİK değerleri.

Suş numarası	Penisilin G konsantrasyonu (mg/l)			
	12.5	6.25	3.125	1.56
12, 13, 70, 72, 74, 78, 95, 97, 98	-	-	-	+
10	-	-	+	+

Ampisilinin 7.8 mg/l (5 MİK) konsantrasyonuna 5 defa maruz bırakılan suş lar için süre sonunda herhangi bir MİK değer i farklılaş ması g örü lmemi ş tir (Tablo 9).

Tablo 9. Ampisilinin 5 MİK'una beş defa maruz bırakılan suş lar için MİK değerleri.

Suş numarası	Ampisilin konsantrasyonu (mg/l)			
	6.25	3.125	1.56	0.78
10 suş un tamamı	-	-	-	+

Gentamisininin 125 mg/l (5 MİK) konsantrasyonuna 5 defa maruz bırakılan suş lardan 5'i için (No:13,70,72,74,97) MİK değerleri 1 dilüsyon artarak 50 mg/l'ye çıkarken, diğ er 5 suş için (No:10, 12,78,95,98) 2 dilüsyon artarak 100 mg/l'ye ulaş mı ş tır (Tablo 10).

Tablo 10. Gentamisinin 5 MİK'una beş defa maruz bırakılan suşlar için MİK değerleri.

Suş numarası	Gentamisin konsantrasyonu (mg/l)			
	100	50	25	12.5
13,70,72,74,97	-	-	+	+
10,12,78,95,98	-	+	+	+

Streptomisinin 1250 mg/l (5 MİK) konsantrasyonuna 5 defa maruz bırakılan suşların 7'si için (No: 10,13,70,72,78,95,98) MİK değerleri 1 dilüsyon artarken, 3 suş için (No: 12,74,97) MİK değerleri ise 2 dilüsyon artmıştır (Tablo 11).

Tablo 11. Streptomisinin 5 MİK'una beş defa maruz bırakılan suşlar için MİK değerleri.

Suş numarası	Streptomisin konsantrasyonu (mg/l)				
	2000	1000	500	250	125
10,13,70,72,78,95,98	-	-	-	+	+
12,74,97	-	-	+	+	+

TARTIŞMA

Enterokoklar hem beta-laktam hem de aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı çeşitli mekanizmalarla direnç kazanmaktadır.

Enterokoklar beta-laktam antibiyotiklere karşı beta-laktamaz üretimi ile enzimatik yoldan veya PBP'lerinde oluşan modifikasyonlar yoluyla direnç kazanabilmektedirler. Enterokokların ribozomlarında oluşan mutasyonlar veya aminoglikozidleri modifiye eden enzimler yoluyla olan inaktivasyon, aminoglikozidlere karşı direnç kazanmalarına neden olmaktadır (44).

Plazmidler tarafından kodlanan beta-laktamazlar, beta-laktam antibiyotiklere karşı dirence neden olabildikleri gibi, düşük penisilin konsantrasyonlarında üretilen enterokok suşlarında da beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç oluşmaktadır. Bu dirençten, düşük penisilin konsantrasyonlarında üretimi indüklenen penisiline karşı düşük afiniteli PBP 5 sorumlu tutulmaktadır (41).

Enterokoklarda, aminoglikozidler için sonradan kazanılan direncin mekanizmalarından biri de, ribozomlarda meydana gelen mutasyonlardır. Ribozomların 30 S alt ünitesindeki S 12 yapısal genindeki mutasyonlar, enterokoklarda streptomisine karşı direnç gelişimine neden olmaktadır (56,59). Ribozomal protein L6'da meydana gelen mutasyonlar da enterokoklarda, gentamisin direncine neden olmaktadır. E.coli'de streptomisin direnci 10^{-9} hücrede oluşurken, M.tuberculosis'te de yaygın olarak görülmektedir (45).

Aminoglikozid antibiyotiklerde, enzimatik yoldan kazanılan direnç, streptomisin için plazmidler tarafından kodlanan, streptomisin adenililtransferaz, gentamisin için yine bir plazmid tarafından kodlanan bifonksiyonel 6' AAC-2' APH enzimi, tarafından meydana getirilmektedir. Ayrıca aminoglikozid direnç genlerinin, aminoglikozidleri üreten organizmalardan orijin aldıkları sanılmaktadır. Diğer bir teori de aminoglikozidleri modifiye eden enzimlerin hücresel metabolizmadaki enzimleri kodlayan genlerden ortaya çıkmış olmasıdır. Buna örnek olarak, sub-MİK'larda 5 pasajdan sonra aac-(6')-Ic geninin regülasyonunun değişmesiyle, AAC'-(6')-I enzimi aminoglikozid direnç profiline sahip olan *S.marcescens* suşları verilebilir (53,54). Fransa'da bulunan ve yüksek düzeyde gentamisin direncine sahip B grubu streptokoklardaki kromozomal direnç bu suşlarda diğer aminoglikozidlere karşı da direnç sağlamaktadır (33).

Ayrıca bakterilerin transport sistemini direkt veya indirekt olarak etkileyen mutasyonlar da enerji yüklü bir membranın oluşmasını sağlayarak aminoglikozidlerin hücre içerisine transportunu azaltarak aminoglikozid direncine neden olmaktadır (9). Nitekim Moellering ve arkadaşları (43) tarafından endokarditli bir hastadan elde edilen *E.faecalis* suşunda, hücre membranındaki bir anomaliye veya intrasellüler hedef hücrelere bağlanmadaki bir bozukluğa bağlı gentamisin direnci tespit edilmiştir.

Sub-MİK'lar, çeşitli bakterilerin morfolojilerini, virulanslarını, konağın fagositozunu ve serumun bakterisidal etkisini değiştirebilirler. Bunun yanında düşük antibiyotik konsantrasyonları dirençli mutanların seleksiyonunu ve direnç plazmidlerinin aktarımı için konjugasyon olayını kolaylaştırmak gibi etkilere de sahiptirler. Ayrıca beta-laktamaz gibi enzimlerin de indüksiyonunu sağlarlar (62). Sub-MİK'larda direnç kazanan bazı bakterilerin hücre duvarlarının permeabilitesi azaldığı için, bakteri için gerekli olan besin ve üreme faktörlerine de permeabilite azalmaktadır. Bu durum, artan gentamisin konsantrasyonlarına maruz bırakılan *S.aureus* suşlarında gözlenmiş ve bu suşlar,

gentamisine karşı direnç kazanmalarına rağmen virulans- larını kaybetmişlerdir (9).

Sub-MİK'lar lag fazının uzamasına neden olmaktadırlar. Sub-MİK bakteri popülasyonunun büyük bir kısmının üremesini önlemekte, fakat dirençli mutantlar üreyebilmektedir (52). Sub-MİK'da seri pasajlar giderek daha yüksek düzeyde dirençli mutantların seçimini sağlayabilmektedir. Nitekim **Thadepalli** ve arkadaşları (57) 20-30 kez siprofloksasinin 1/2 MİK'unda pasajını yaptıkları *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *P.vulgaris* suşları için, MİK değerlerinin 4 kat arttığını göstermişlerdir. Antibiyotiklerin subinhibitör konsantrasyon- larının rutin olarak hayvan yemlerinde kullanılması, hayvanla- rın barsak florasında dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmak- tadır (9).

Antibiyotiklere karşı tedavi sırasında gelişen direncin infeksiyon bölgelerindeki sub-MİK seviyelerle sağlanması muhtemeldir. Bu şekilde bakterilerin çoğunun üremesinin önlenmesi yanında daha dirençli bireyler seçilmektedir (52). Geniş spektrumlu penisilinler kullanılırken direncin ortaya çıkma oranı ortalama % 9.2, tedavinin başarısız olma ihtimali % 5.2 olarak bulunmuştur. Aminoglikozidler için yapılan monoterapide direncin ortaya çıkma oranı % 13.4 iken tedavide buna bağlı % 11.4 oranında başarısızlık tespit edilmiştir. Bu sonuçlar araştırmadan araştırmaya değişiklik göstermektedir. Örneğin seftazidimin tedavide kullanılmasıyla direnç gelişiminin oranı çeşitli araştırmacılara göre % 5.7 ve % 25 arasında değişmektedir (60).

Sub-MİK'ların yanında supra-MİK'larda da bakterilerde direnç oluşabilmektedir. Yüksek penisilin konsantrasyonları enterokokların otolitik enzim aktivitesini de etkilemektedir. Penisilin, enterokoklar üzerinde bakterisidal aktivite göstermesinde bakterinin iki enzimi (EF ve ML enzimleri) rol oynar. Yüksek penisilin konsantrasyonlarında da üremesini sürdürebilen (paradoksal etki gösteren) enterokok suşlarında EF en- ziminin aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Penisilinlerin yüksek konsantrasyonlarında bakterisidal aktivitelerini göstermeleri için bu enzim gereklidir (17, 18).

Subinhibitör antibiyotik konsantrasyonlarının direnç oluşumuna etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Carsenti-Etesse ve arkadaşları (5) 6 S.pneumoniae suşunun, ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, imipenem, sefiksime, sefatrizin, sefadroksil ve sefuroksimin subinhibitör konsantrasyonlarında seri pasajlarını yapmışlar ve suşların pek çoğu için MİK'ların 4 kat, bazı suşlar için 32 kat kadar arttığını saptamışlardır. Bu çalışmada aminopenisilinler ve sefiksimde pasaj bütün beta-laktam antibiyotiklere direnç artışı sağlarken, sefiksim dışındaki sefalosporinlerde yapılan pasajlar genellikle yalnız o antibiyotiğe direnç artışı sağlamıştır.

Ülkemizde Çokça ve Altay (8) 1/2 MİK ampisilin içeren besiyerinde 10 gün pasaj yaptıkları E.coli suşları için amipisilin MİK'larının 4 kat artmış olduğunu tespit etmişlerdir.

Hodges ve arkadaşları (31) Solomon adalarında yaşayan insanlardan izole ettikleri ve daha önce antibiyotiklerle karşılaşmamış E.faecalis suşları ile çalışmışlar, penisilin basamak şeklinde artan konsantrasyonlarına maruz bıraktıkları suşlar için, MİK'un 10 katına varan oranlarda direnç artışı ve tolerans gelişimi, 10 MİK'una aralıklı olarak 5 defa maruz bıraktıkları suşlarda ise sadece tolerans gelişimi gözlemişlerdir. MİK değerinde veya üzerindeki sabit bir konsantrasyonda pasajı yapılan suşlarda ise çok az oranda direnç artışı tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda, penisilin G'nin 1/2 ve 1/4 MİK'larında 10 defa pasajı yapılan E.faecalis suşlarında bir direnç gelişimi gözlenmemiştir. Penisilin G'nin 5 MİK'una 5 gün süreyle maruz bırakılan 1 E.faecalis suşunda ise 1 dilüsyonluk direnç artışı gözlenmiştir. Ampisilinin 1/2 ve 1/4 MİK'larında yapılan pasajlarda ise deneyin 3.gününden itibaren MİK değerleri bütün suşlar için 1 dilüsyon artış göstermiş daha sonraki pasajlarda direnç düzeyi daha ileriye götürülemediği görülmüştür. Ampisilinin 5 MİK'una 5 gün süreyle maruz bırakılan suşların MİK değerlerinde ise bir değişikliğe rastlanmamıştır. Aralıklı olarak penisilin G'nin 5 MİK'una 5 gün süreyle maruz bıraktığımız 1 E.faecalis suşu, penisiline 1 dilüsyon

direnç kazanırken, diğer direnç gelişimi gözlenmeyen 9 suş ve ampisilinle yapılan deneylerde aldığımız sonuçlar Hodges ve arkadaşları (31)'nin çalışmalarıyla uyumludur. Bu araştırmacılar artan penisilin konsantrasyonlarında pasaj yaptıkları suşlar için MİK değerlerinde 10 kat artış gözlerken, çalışmamızda sadece ampisilin için 2 kat artış gözlenmiştir. Kullandığımız E.faecalis suşları beta-laktamaz oluşturmadığı için bu direnç artışından başka mekanizmaların sorumlu olduğu düşünülmüştür. Örneğin düşük afiniteli PBP 5'in sentezinin sub-MİK'larda indüklenmesi, ayrıca stafilokoklarda görüldüğü gibi düşük antibiyotik konsantrasyonlarında PBP genlerinde dirence neden olabilecek bir mutasyonun meydana gelmesi (26), yine düşük antibiyotik konsantrasyonlarında enterokok hücre duvarında dirence neden olabilecek bir kalınlaşmanın oluşması da akla gelebilecek mekanizmalardır (25).

Aminoglikozidlerin sub-MİK'larında direnç gelişimi ile ilgili çok az yayına rastladık. Grassi (21) gentamisin sub-MİK'larında yapılan seri pasajlar sonucu E.coli ve S.aureus suşları için MİK'ların orta seviyede artmış olduğunu tespit etmiştir. Bu suşlarda aminoglikozid fosfotransferaz ve asetiltransferaz enzimlerinin de artmış olduğu bulunmuştur.

Ülkemizde Çokça ve Altay (8) 1/2 MİK amikasin ve gentamisin içeren besiyerlerinde 1 E.coli suşunun pasajını yapmışlar ve gentamisin MİK'unun 4 kat, amikasinin MİK'unun 2 kat kadar artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Gentamisin MİK değeri 1.5 mg/l iken, 10 pasaj sonrasında 6 mg/l'ye, amikasinin MİK değeri 4 mg/l iken 8 mg/l'ye ulaşmıştır.

Kullandığımız E.faecalis suşları için streptomisin MİK değeri 250 mg/l, gentamisin için ise 25 mg/l olarak tespit edilmiştir. Pek çok çalışmada E.faecalis suşları için streptomisin ortalama MİK değeri 250 mg/l, gentamisininki ise 8-64 mg/l arasında bildirilmiştir (44). Tespit ettiğimiz değerler de bu sınırlar içerisindedir.

Streptomisinin 1/4 MİK'unda 10 defa pasajını yaptığımız *E.faecalis* suşlarından biri için MİK değerinin 8 kat artarak 2000 mg/l'ye, ikisi için 4 kat artarak 1000 mg/l'ye, üçü için 2 kat artarak 500 mg/l'ye ulaştığı saptanmıştır. 1/2 MİK'da pasajını yaptığımız 1 suş için MİK değeri 32 kat artarak 8000 mg/l'ye ulaşırken, 1/2 MİK'da pasajını yaptığımız 9, 1/4 MİK'unda pasajını yaptığımız 4 suş için MİK değerleri 128 kat artarak 32000 mg/l'ye ulaşmıştır. Streptomisinin 5 MİK'una 5 gün süreyle maruz bırakılan 3 suşta ise MİK değerleri 4 kat artarak 1000 mg/l'ye, 7 suşta ise 2 kat artarak 500 mg/l'ye ulaşmıştır.

Aminoglikozid antibiyotiklerin sub-MİK'larında bakterilerde membran değişiklikleri görülmekte ve bu durum direnç gelişimine neden olabilmektedir. Streptomisin direncine sahip suşlarda, streptomisinin in-vitro etkisine duysız ribozomlar bulunmuştur (34,59). Bizim kullandığımız suşlarda da ribozomlarda meydana gelen mutasyonlar streptomisin direncine neden olmuş olabilir.

Gentamisinin 1/2 ve 1/4 MİK'larında 10 defa seri pasajını yaptığımız *E.faecalis* suşlarında da streptomisin ile yaptığımız çalışmadakine benzer sonuçlar elde edilmiştir. 1/2 MİK gentamisin konsantrasyonunda 10 defa pasajını yaptığımız 2 suş için MİK değerlerinin 16 kat artarak 400 mg/l'ye, 7 suş için 8 kat artarak 200 mg/l'ye, 1 suş için ise 4 kat artarak 100 mg/l'ye ulaştığı saptanmıştır. Gentamisinin 1/4 MİK'unda pasajını yaptığımız 7 suş için MİK değerlerinin 8 kat artarak 200 mg/l'ye, 3 suş için ise 4 kat artarak 100 mg/l'ye ulaştığı belirlenmiştir. Gentamisinin 5 MİK'una 5 gün süreyle aralıklı olarak maruz bıraktığımız 5 suş için MİK değerleri 4 kat artarak 100 mg/l'ye, 5 suş için ise 2 kat artarak 50 mg/l'ye yükselmiştir.

Ulaştığımız maksimum gentamisin direnci, yüksek seviyede gentamisin direnci olan 500 mg/l sınırından daha düşük düzeydedir. Ulaştığımız dirençten ribozomlarda oluşan

bir mutasyonun veya hücre permeabilitesindeki azalışın sorumlu olduğu düşünülebilir.

Antibiyotiklerin sub-MİK veya supra-MİK'larına maruz bırakılan bakterilerde direnç gelişebileceğini ve antibiyotik-bakteri karşılaşmasının dirençli mutantların seleksiyonunu sağlayabileceğini gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada da, aminoglikozid grubu antibiyotiklerden gentamisin ve streptomisin sub-MİK'larında pasajı yapılan enterokok suşlarında bulunan dirençli mutantların seleksiyonu sağlanarak, daha dirençli enterokok suşları elde edilmeye çalışılmış ve yüksek düzeyde streptomisin direncine sahip enterokok suşları elde edilmiştir. Gentamisin için de MİK'da 16 kata varan artışlar saptanmışsa da yüksek düzeyde gentamisin direncine erişen suş bulunmamıştır. Beta-laktam grubu antibiyotiklerle yapılan çalışmada ise, sadece ampicilinin sub-MİK değerlerinde yapılan pasajlarda enterokoklar için MİK'larda 1 dilüsyon kadar artış gözlenirken, penisilin G ile yapılan çalışmada direnç gelişimi elde edilememiştir. Aralıklı olarak MİK'ların üzerindeki konsantrasyonlarda antibiyotik şokuna maruz bırakılan enterokok suşlarında, streptomisin ve gentamisine dirençli suşlar elde edilirken, beta-laktam antibiyotiklerden sadece penisilin G ile yapılan çalışmada 1 suшта direnç artışı saptanmış, ampicilin ile yapılan çalışmada ise herhangi bir direnç gelişimi gözlenmemiştir.

SONUÇLAR

1. Penisilin G'nin 1/4 ve 1/2 MİK'larında 10 defa pasajı yapılan suşlar için MİK değerleri değişmemiş ve 1.56 mg/l olarak kalmıştır.
2. Ampisilinin 1/4 ve 1/2 MİK'larında 10 defa pasajı yapılan suşların tamamı için MİK değerleri 1 dilüsyon artarak 1.56 mg/l'den 3.125 mg/l'ye ulaşmıştır.
3. Gentamisin 1/4 MİK'unda 10 defa pasajı yapılan 7 suş için MİK değerleri 25 mg/l'den 3 dilüsyon artış göstererek 200 mg/l'ye ulaşırken, 3 suş için 2 dilüsyon artarak 100 mg/l'ye çıkmıştır. Gentamisin 1/2 MİK'unda 10 defa pasajı yapılan 2 suş için MİK değerleri 4 dilüsyon artarak, 25 mg/l'den 400 mg/l'ye ulaşırken, 7 suş için 3 dilüsyon artarak 200 mg/l'ye, 1 suş için 2 dilüsyon artarak 25 mg/l'den 100 mg/l'ye ulaşmıştır.
4. Streptomisin 1/4 MİK'unda 10 defa pasajı yapılan 4 suş için MİK değerleri 7 dilüsyon artarak 250 mg/l'den 32000 mg/l'ye, 1 suş için 3 dilüsyon artarak 2000 mg/l'ye, 2 suş için 2 dilüsyon artarak 1000 mg/l'ye, 3 suş için 1 dilüsyon artarak 500 mg/l'ye ulaşmıştır. Streptomisin 1/2 MİK'unda, 10 defa pasajı yapılan 9 suş için MİK değerleri 7 dilüsyon artarak 250 mg/l'den 32000 mg/l'ye, 1 suş için 5 dilüsyon artarak 8000 mg/l'ye ulaşmıştır.
5. Penisilin G'nin 5 MİK değerindeki antibiyotik konsantrasyonuna 5 defa maruz bırakılan 1 suş için MİK değeri 1 dilüsyon kadar artarak 3.125 mg/l'den 6.25

mg/l'ye çıkarırken, diğer suşlar için MİK'larda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

6. Ampisilinin 5 MİK değerindeki antibiyotik konsantrasyonuna 5 defa maruz bırakılan suşlar için MİK değerlerinde bir değişiklik gözlenmemiştir.
7. Gentamisin'in 5 MİK değerindeki antibiyotik konsantrasyonuna 5 defa maruz bırakılan 5 suş için MİK değerleri 2 dilüsyon artarak 25 mg/l'den 100 mg/l'ye, diğer 5 suş için de 1 dilüsyon artarak 50 mg/l'ye ulaşmıştır.
8. Streptomisin'in 5 MİK değerindeki antibiyotik konsantrasyonuna 5 defa maruz bırakılan 3 suş için MİK değerleri 2 dilüsyon artarak 250 mg/l'den 1000 mg/l'ye ulaşırken, 7 suş için 1 dilüsyon artarak 500 mg/l'ye ulaşmıştır.

ÖZET

Bu çalışmada, penisilin G, ampisilin, gentamisin ve streptomisinin sub-MİK ve supra-MİK değerlerinde pasajı yapılan *Enterococcus faecalis* suşlarında direnç gelişimi araştırılmıştır.

Deneyde agar dilüsyon yöntemi kullanılarak, MİK değerleri aynı olan 10 *Enterococcus faecalis* suşu seçilmiş ve antibiyotiklerin 1/2 ve 1/4 MİK değerlerini içeren buyyonda pasajları yapılmıştır. Her pasaj sonrasında, suşlar için Müller Hinton agarda dilüsyonla MİK değerleri tekrar belirlenmiş, MİK'larının artmış olduğu saptanan suşlarda, en yüksek antibiyotik konsantrasyonunu içeren agardan alınan bakterilerin yeni tespit edilen MİK değerlerinin 1/2 ve 1/4 MİK'larını içeren buyyonda süspanse edilmesiyle, deney 10 pasaj tamamlanıncaya kadar sürdürülmüştür.

Penisilin G'nin 1/2 ve 1/4 MİK değerlerinde pasajı yapılan suşlarda direnç gelişimi gözlenmezken, ampisilinin 1/2 ve 1/4 MİK değerlerini içeren buyyonda pasajı yapılan suşlar için MİK değerlerinin 1 dilüsyon kadar artmış olduğu tespit edilmiştir. Gentamisin ve streptomisinin 1/2 ve 1/4 MİK değerlerinde pasajı yapılan suşların tamamında ise değişik düzeylerde direnç gelişimi saptanmıştır. Gentamisinin 1/4 MİK'unda pasajı yapılan 7 suş için MİK değerleri 10 pasaj sonunda 3 dilüsyon artarken, 3 suş için 2 dilüsyon artmıştır. Gentamisinin 1/2 MİK'unda pasajı yapılan 2 suş için MİK değerleri 10 pasaj sonunda 4, 7 suş için 3, 1 suş için de 2 dilüsyon artmıştır. Streptomisinin 1/4 MİK'unda 10 defa pasajı yapılan 1 suş için MİK değeri 3 dilüsyon artarken, 2 suş için

2 dilüsyon, 3 suş için de 1 dilüsyon artmıştır. 4 suşta ise bu artış 7 dilüsyonu bulmuştur. Streptomisin'in 1/2 MİK'unda 10 defa pasajı yapılan 9 suş için MİK değerleri 7 dilüsyon artarken, 1 suş için 5 dilüsyon artmıştır.

Çalışmamızın diğer bölümünde, enterokok suşları antibiyotiklerin 5 MİK'unu içeren antibiyotik konsantrasyonlarına 5 defa 7.5 saatlik sürelerle maruz bırakılmış ve penisilin G'nin 5 MİK'una maruz bırakılan 1 suş için MİK değerinde 1 dilüsyon kadar artış görülürken, ampicilin'in 5 MİK'una maruz bırakılan suşlar için MİK değerlerinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Gentamisin'in 5 MİK'una maruz bırakılan 5 suş için MİK değerleri 2 dilüsyon artarken, 5 suş için 1 dilüsyon artmıştır. Streptomisin'in 5 MİK'una maruz bırakılan 3 suş için MİK değerleri 2 dilüsyon artış gösterirken, 7 suş için 1 dilüsyon artış göstermiştir.

Penisilin için düşük afiniteye sahip PBP (örneğin PBP 5)'lerin sentezi sub-MİK'larda indüklenmektedir. Bu düşük antibiyotik seviyeleri, bakterilerin ribozomlarında mutasyonlar oluşturabildiği gibi bazen de hücre duvarının permeabilitesini azaltacak bir kalınlaşmaya neden olmaktadır. Sub-MİK düzeylerde inkübe edilen bakterilerde, gizli veya hücredeki metabolik enzimleri kodlayan genlerde de dirence neden olabilecek mutasyonların oluşabileceği bildirilmiştir. Direnç nedeni ne olursa olsun, sub-MİK ve supra-MİK antibiyotik seviyeleri, daha dirençli bakteri mutantlarının seleksiyonunu sağlayarak, dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkmasını sağlamaktadırlar.

SUMMARY

The aim of this work was to develop resistance to penicillin G, ampicillin, gentamicin and streptomycin in *Enterococcus faecalis* cultures at sub-MIC and supra-MIC levels of antibiotics.

Using the agar dilution method, 10 *Enterococcus faecalis* strains with same the MIC values were selected and subcultured in media containing these antibiotics at 1/2 and 1/4 MIC levels. After each passage, MIC values were redetermined using a dilution method in Mueller-Hinton agar. From the strains whose MIC values were enhanced, bacterial cultures were selected from the highest antibiotic containing agar plates and resuspended in media containing antibiotics at 1/2 and 1/4 MIC levels based on the newly determined MIC values. Then the experiments were continued until 10 passages completed.

While no change was observed in these strains to penicillin G after exposing to 1/2 and 1/4 MIC levels of this antibiotic, a 1 dilution increase in their MIC values was detected when ampicillin was included in the growth medium at 1/2 and 1/4 MIC levels. On the other hand, all of these strains exhibited various levels of resistance to gentamicin and streptomycin after treating them with 1/2 and 1/4 MIC levels of these antibiotics. After 10 passages in media containing 1/4 MIC gentamicin, 7 strains showed a 3 dilution and 3 strains exhibited a 2 dilution increase in their MIC values, whereas 1/2 MIC gentamicin led to a 4 dilution increase in 2 of the strains, a 3 dilution increase for 7 strains and a 2 dilution increase in 1 strain in their respective MIC values. After 10 passages, in a

media containing $1/4$ MIC streptomycin, one strain showed a 3 dilution, 2 strains showed a 2 dilution, 3 strains possessed a 1 dilution increase, while the remaining 4 strains manifested a 7 dilution increase in their respective MIC values. When $1/2$ MIC streptomycin was included in the growth, 9 of the strains showed a 7 dilution increase, whereas 1 strain had a 5 dilution increase in MIC values after 10 passages.

In the remaining part of our work, *Enterococcus* strains were exposed five times to various antibiotics at 5 MIC levels for 7.5 hour intervals. The results showed that 1 strain had a 1 dilution increase to penicillin G, whereas there was no change in MIC values when the medium was supplemented with 5 MIC ampicillin. On the other hand, in the presence of 5 MIC gentamicin, a 2 dilution increase in 5 strains and a 1 dilution increase in the other 5 strains was detected. In the presence of 5 MIC streptomycin, it was found that there was a 2 dilution increase in 3 strains and a 1 dilution increase in 7 strains in their respective MIC values.

There are several reasons for bacteria to develop resistance to such antibiotics. At sub-MIC levels of antibiotic concentrations, synthesis of PBP (e.g PBP 5) which has a low affinity to penicillin is induced. Upon incubation, these low antibiotic levels may not only lead to mutation of the bacterial ribosomes, but they can also cause the thickening of the cell wall which can lead to low permeability. It has been reported that sub-MIC levels can lead to mutations of the cryptic genes or the genes which encode metabolic enzymes ultimately leading a resistance. Whatever the reason for the resistance, sub-MIC and supra-MIC levels of antibiotics provide a selection of more antibiotic resistant mutants which evolve to form resistant bacterial strains.

KAYNAKLAR

1. Akalın H E: Aminoglycoside'ler, **Antibiyotik Bülteni 2(1): 3** (1992).
2. Bantar C E, Micucci M, Canigia F, Smayevsky J, Bianchini H M: Synergy characterization for *Enterococcus faecalis* strains displaying moderately high-level gentamicin and streptomycin resistance, **J Clin Microbiol 31: 1921** (1993).
3. Bartoloni A, Stefani S, Orsi A, Nicoletti A, Difenzo A R, Paradisi F: High level aminoglycoside resistance among enterococci isolated from blood cultures, **J Antimicrob Chemother 29: 729** (1992).
4. Cars O, Odenholt-Tornqvist I: The postantibiotic sub-MIC effect in-vitro and in-vivo, **J Antimicrob Chemother 31(Suppl D): 159** (1993).
5. Carsenti-Etesse H, Durant J, De Salvador F, Bensoussan M, Bensoussan F, Pradier C, Thabaut A, Dellamonica P: In-vitro development of resistance to beta-lactam antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*, **J Antimicrob Chemother 36: 417** (1995).
6. Coudron P E, Markowitz S M, Wong E S: Isolation of a beta-lactamase -producing, aminoglycoside-resistant strain of *Enterococcus faecium*, **Antimicrob Agents Chemother 36: 1125** (1992).
7. Courvalin P: Resistance of enterococci to glycopeptides, **Antimicrob Agents Chemother 34: 2291** (1990).

8. Çokça F, Altay G: Subinhibitör antibiyotik konsantrasyonlarının bakterilerde direnç gelişimi üzerine etkileri, **Mikrobiyol Bult 26: 333 (1992).**
9. Davies J E: Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes "V Lorian (ed): **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 3. baskı" kitabında, s.699, Williams Wilkins Co, Baltimore (1991).
10. Eng R H K, Ng K, Smith S M: Susceptibility of resistant *Enterococcus faecium* to unusual antibiotics, **J Antimicrob Chemother 31: 609 (1993).**
11. Entenza J M, Calandra T, Moosmann Y, Malinvern R, Glauser M P: Teicoplanin versus vancomycin for prophylaxis of experimental *Enterococcus faecalis* endocarditis in rats, **Antimicrob Agents Chemother 36: 1256 (1992).**
12. Facklam R R, Collins M D: Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme, **J Clin Microbiol 27: 731 (1989).**
13. Facklam R R, Washington II J A: Streptococcus and related catalase-negative Gram positive cocci, "A Balows, W J Hausler, K L Herrmann, H D Isenberg, H J Shadomy (eds): **Manual of Clinical Microbiology**, 5. baskı" kitabında s.238, Am Soc Microbiol, Washington (1991).
14. Felmingham D, Wilson A P R, Quintana A I, Grüneberg R N: *Enterococcus* species in urinary tract infection, **Clin Infect Dis 15: 295 (1992).**
15. Ferrara A, Dos Santos C, Cimbri M: High level gentamicin-resistant enterococci: In-vitro activity of double and triple combinations of antimicrobial drugs, **Chemotherapy 42: 37 (1996).**
16. Fontana R, Aldegheri M, Ligozzi M, Lopez H, Sucari A, Satta G: Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*, **Antimicrob Agents Chemother 38: 1980 (1994).**

17. Fontana R, Amalfitano G, Rossi L, Satta G: Mechanisms of resistance to growth inhibition and killing by beta-lactam antibiotics in enterococci, **Clin Infect Dis** 15: 486 (1992).
18. Fontana R, Boaretti M, Grossato A, Tonin E A, Lleo' M M, Satta G: Paradoxical response of *Enterococcus faecalis* to the bactericidal activity of penicillin is associated with reduced activity of one autolysin, **Antimicrob Agents Chemother** 34: 314 (1990).
19. Gold H S, Ünal S, Cercenado E, Thauvin-Eliopoulos C, Eliopoulos G M, Wennersten C B, Moellering Jr R C: A gene conferring resistance to vancomycin but not teicoplanin in isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* demonstrates homology with vanB, vanA and vanC genes of enterococci, **Antimicrob Agents Chemother** 37: 1604 (1993).
20. Graniger W, Ragette R: Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis, **Clin Infect Dis** 15: 49 (1992).
21. Grassi G G: Drug inactivating enzymes of bacteria grown in subminimal inhibitory concentrations of antibiotics, **Rev Infect Dis** 1: 852 (1979).
22. Gray J W, Stewart D, Pedler S J: Species identification and antibiotic susceptibility testing of enterococci isolated from hospitalized patients, **Antimicrob Agents Chemother** 35: 1943 (1991).
23. Grayson M L, Eliopoulos G M, Wennersten C B, Ruoff K L, De Girolami P C, Ferraro M, Moellering Jr R C: Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: A 22 year review at one institution, **Antimicrob Agents Chemother** 35: 2180 (1991).
24. Greenwood D: **Antimicrobial Chemotherapy**, 2.baskı kitabında s.40, Oxford University press, New York (1990).

25. Greenwood D, Bidgood K, Turner M: A comparison of the responses of staphylococci and streptococci to teicoplanin and vancomycin, *J Antimicrob Chemother* 20: 155 (1987).
26. Hackbarth C J, Kocagöz T, Kocagöz S, Chambers H F: Point mutations in *Staphylococcus aureus* PBP 2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 103 (1995).
27. Handwerger S, Perlman D C, Altarac D, McAuliffe V: Concomitant high-level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of enterococci, *Clin Infect Dis* 14: 655 (1992).
28. Hasçelik G, Gür D, Akalın H E, Berkman E: Çeşitli örneklerden izole edilen *Enterococcus*'ların tiplendirilmesi ve gentamisine direnç düzeylerinin saptanması (Özet), *ANKEM Derg* 4 : 240 (1990).
29. Hellinger W C, Rouse M S, Rabadan P M, Henry N K, Steckelberg J M, Wilson W R: Continuous intravenous versus intermittent ampicillin therapy of experimental endocarditis caused by aminoglycoside-resistant enterococci, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1272 (1992).
30. Herman D J, Gerding D L: Antimicrobial resistance among enterococci, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1 (1991).
31. Hodges T L, Zigelboim-Daum S, Eliopoulos G M, Wennersten C, Moellering Jr R C: Antimicrobial susceptibility changes in *Enterococcus faecalis* following various penicillin exposure regimens, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 121 (1992).
32. Jett B D, Huycke M M, Gilmore M S: Virulence of enterococci, *Clin Microbiol Rev* 7: 462 (1994).

33. Kaufhold A, Podbielski A, Horaud T, Ferrieri P: Identical genes confer high-level resistance to gentamicin upon *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Streptococcus agalactiae*, **Antimicrob Agents Chemother** 36: 1215 (1992).
34. Krogstad D, Moellering Jr R C: Antibiotic combinations, "V Lorian (ed): **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 2. baskı" kitabında s. 537, Williams Wilkins Co, Baltimore (1986).
35. Landman D, Mobarakai N K, Quale J M: Novel antibiotic regimens against *Enterococcus faecium* resistant to ampicillin, vancomycin and gentamicin, **Antimicrob Agents Chemother** 37: 1904 (1993).
36. Lorian V: Low concentrations of antibiotics, **J Antimicrob Chemother** 15 (Supp A): 15 (1985).
37. Lorian V: Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: Effects on ultrastructure their virulence and susceptibility to immunodefenses, "V Lorian (ed): **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 2. baskı" kitabında s.596 Williams and Wilkins, Baltimore (1986).
38. Maggiolo F, Taras A, Frontespezi S, Legnani M C, Silanos M A, Pravettoni G, Suter F: Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of imipenem on *Pseudomonas aeruginosa* in an in-vitro dynamic model, **Antimicrob Agents Chemother** 38: 1416 (1994).
39. Mandell G L, Kaye D, Levison M E, Hook E W: Enterococcal endocarditis, **Arch Intern Med** 125: 258 (1970).
40. Markowitz S M, Wells V D, Williams D S, Stuart C G, Coudron P E, Wong E S: Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of beta-lactamase producing, aminoglycoside-resistant isolates of *Enterococcus faecalis*, **Antimicrob Agents Chemother** 35: 1075 (1991).

41. Moellering Jr R C: The Enterococcus: A classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options, **J Antimicrob Chemother** 28: 1 (1991).
42. Moellering Jr R C: Emergence of Enterococcus as a significant pathogen, **Clin Infect Dis** 14: 1173 (1992).
43. Moellering Jr R C, Murray B E, Schoenbaum S C, Adler J A, Wennersten C B: A novel mechanism of resistance to penicillin-gentamicin synergism in *Streptococcus faecalis*, **J Infect Dis** 141: 81 (1980).
44. Murray B E: The life and times of the Enterococcus, **Clin Microbiol Rev** 3: 46 (1990).
45. Murray B E, Hodel-Christian S L: Bacterial resistance: Theoretical and practical consideration, mutations to antibiotic resistance, characterization of R plasmids and detection of plasmid-specified genes "V Lorian (ed): **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 3.baskı" kitabında s.556, Williams and Wilkins Co, Baltimore (1991).
46. NCCLS: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 2. baskı, Document M2-A4, Villanova (1990).
47. O'Connell C J: *Streptococcus*, "F Milgram, T D Flanagan (eds): **Medical Microbiology**, 1.baskı" kitabında s.263, Churchill Livingstone Inc, New York (1982).
48. Oster S E, Chirugi V A, Goldberg A A, Aiken S, McCabe R E: Ampicillin-resistant enterococcal species in an acute-care hospital, **Antimicrob Agents Chemother** 34: 1821 (1990).
49. Patterson J E, Wanger A, Zscheck K K, Zervos M J, Murray B E: Molecular epidemiology of beta-lactamase producing enterococci, **Antimicrob Agents Chemother** 34: 302 (1990).

50. Rice L B, Eliopoulos G M, Wennersten C, Goldmann D, Jacoby G A, Moellering Jr R C: Chromosomally mediated beta-lactamase production and gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis*, **Antimicrob Agents Chemother** 35: 272 (1991).
51. Rice L B, Marshall S H: Evidence of incorporation of the chromosomal beta-lactamase gene of *Enterococcus faecalis* CH19 into a transposon derived from staphylococci, **Antimicrob Agents Chemother** 36: 1843 (1992).
52. Rolinson G N: Sub-inhibitory concentrations of antibiotics, **J Antimicrob Chemother** 3: 111 (1977).
53. Shaw K J, Rather P N, Hare R S, Miller G H: Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationship of the aminoglycoside-modifying enzymes, **Microbiol Rev** 57: 138 (1993).
54. Shaw K J, Rather P N, Sabatelli F J, Mann P, Munayyer H, Mierzwa R, Petrikos G L, Hare R S, Miller G H, Bennett P, Downey P: Characterization of the chromosomal *aac* (6')-Ic gene from *Serratia marcescens*, **Antimicrob Agents Chemother** 36: 1447 (1992).
55. Smith M C, Murray B E: Sequence analysis of the beta-lactamase repressor from *Staphylococcus aureus* and hybridization studies with two beta-lactamase - producing isolates of *Enterococcus faecalis*, **Antimicrob Agents Chemother** 36: 2265 (1992).
56. Stinson M W: Chemotherapeutics and antibiotics, "F Milgrom, T D Flanagan (eds): **Medical Microbiology** 1. baskı" kitabında s 53, Churchill Livingstone Inc, New York (1982).
57. Thadepalli H, Bansal M B, Rao B, See R, Chuah S K, Marshall R, Dhawan V K: Ciprofloxacin: In-vitro, experimental, and clinical evolution, **Rev Infect Dis** 10: 505 (1988).

58. Thal L A, Chow J W, Patterson J E, Perri M B, Donabedian S, Clewell D B, Zervos M J: Molecular characterization of highly gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates lacking high-level streptomycin resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 37: 134 (1993).
59. Töreci K: Kemoterapötiklere direnç mekanizmaları, *KÜKEM Derg* 9: 41 (1986).
60. Töreci K: Antibiyotik direnç mekanizmaları, *ANKEM Derg* 3 : 445 (1989).
61. Töreci K: *Enterococcus* infeksiyonları, laboratuvar tanısı, epidemiyoloji, korunma, *Ders notları* s.15, (1996).
62. Töreci K, Kaygusuz A: Çeşitli antibiyotiklerin subminimal inhibitör konsantrasyonlarının çeşitli bakteriler üzerine etkileri I.Amikasin ile alınan sonuçlar, *ANKEM Derg* 8: 368 (1994).
63. Töreci K, Öngen B: İdrardan izole edilen enterokok suşlarında antibiyotik direnci, *ANKEM Derg* 7 : 92 (1993).
64. Ünal S: İnfektif endokardit: Sorun bakteriler, stafilokok ve enterokok, *ANKEM Derg* 7 : 167 (1993).
65. Watanakunakorn C: Rapid increase in the prevalence of high-level aminoglycoside resistance among enterococci isolated from blood cultures during 1989-1991, *J Antimicrob Chemother* 30: 289 (1992).
66. Whitman M S, Pitsakis P G, Zausner A, Livornese L L, Osborne A J, Johnson C C, Levison M E: Antibiotic treatment of experimental endocarditis due to vancomycin- and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*, *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2069 (1993).

67. Winstanley T G, Hastings J G M: Synergy between penicillin and gentamicin against enterococci, **J Antimicrob Chemother** 25: 551 (1990).
68. Woodford N, McNamara E, Smyth E, George R C: High-level resistance to gentamicin in *Enterococcus faecium*, **J Antimicrob Chemother** 29: 395 (1992).
69. Woodford N, Morrison D, Cookson B, George R C: Comparison of high-level gentamicin resistant *Enterococcus faecium* isolates from different continents, **Antimicrob Agents Chemother** 37: 681 (1993).
70. Yao J D C, Moellering Jr R C: Antibacterial agents, "A Balows, W J Hausler, K L Herrmann, H D Isenberg, H J Shadomy (eds): **Manuel of Clinical Microbiology**, 5. baskı" kitabında s.1065, Am Soc Microbiol, Washington (1991).
71. Zanon U: Sub-inhibitory levels of antibiotics, **J Antimicrob Chemother** 3: 106 (1977).
72. Zscheck K K, Murray B G: Nucleotide sequence of the beta-lactamase gene from *Enterococcus faecalis* HH22 and its similarity to staphylococcal-beta-lactamase genes, **Antimicrob Agents Chemother** 35: 1736 (1992).

ÖZGEÇMİŞ

1965 yılında Konya'da doğdum. İlkokul ve ortaokulu bitirdikten sonra, Kuleli Askeri Lisesi'nde lise eğitimimi tamamladım. 1983-1984 yılları arasında Boğaziçi Üniversitesi, İngilizce Hazırlık sınıfına devam ettim. 1984 yılında, Boğaziçi Üniversitesi'ndeki Kimya eğitimimi bırakarak, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bölümler Bölümü'ne kaydımı yaptırdım. 1988 yılında mezun olduktan sonra, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. 1990 yılında "3.kuşak sefalosporinlerin Türkiye'de izole edilen çeşitli suşlara 'Paradoksal Antibiyotik Etki' gösterip göstermediğinin araştırılması ve sefmenoksimin çeşitli bakterilere etkisi" konulu tezi vererek Yüksek Lisans eğitimimi tamamladım. 1990 yılında aynı enstitüye bağlı olarak İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. 1991 yılında doktora yeterlilik sınavını verdikten sonra, 1992-1993 yılları arasında New York Medical College'de bir yıl süreyle "Lyme hastalığı etkeni olan Borrelia burgdorferi'nin immunojenik proteinlerinin bakteriyofajlar vasıtasıyla izolasyonu" konusunda çalışmalarda bulundum. Türkiye'ye döndükten sonra aynı Anabilim Dalı'nda tez çalışmalarına devam ettim.