

18131

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

Tez Yöneticisi:  
Prof.Dr. Enver Tali ÇETİN

SEFTRİAKSONUN AMİKASİN, NETİLMİSİN VE TOBRAMİSİN  
İLE KOMBİNASYONLARININ PSEUDOMONAS AERUGINOSA  
SUŞLARINA KARŞI İN VİTRO ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi

Arş.Gör. Alev Yergök

İstanbul, 1990

Tezimin yürütülmesinde ilgi ve desteğini gördüğüm, değerli bilgilerinden yararlandığım, Hocam Prof.Dr. Enver Tali ÇETİN'e şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımnda beni destekleyen ve yardımlarını esirgemyen Prof.Dr. Gülten ÖTÜK'e teşekkür ederim.

Değerli bilgilerinden yararlandığım Hocalarım Prof.Dr. Özdem ANĞ, Prof.Dr. Kurtuluş TÖRECI, Prof.Dr. Ömer KASIMOĞLU'na teşekkür ederim.

Fotoğrafların çekimi ve baskısında bana yardımcı olan Merih AKOĞUL ve Levent TONOZ'a teşekkür ederim.

## İ Ç İ D E K İ L E R

	<u>Sayfa No</u>
GİRİŞ . . . . .	1
GENEL BİLGİLER . . . . .	4
GEREÇ VE YÖNTEM . . . . .	15
BULGULAR . . . . .	24
TARTIŞMA . . . . .	32
SONUÇ . . . . .	46
ÖZET . . . . .	48
KAYNAKLAR . . . . .	49

## G İ R İ Ş

*Pseudomonas aeruginosa* ilk kez 1882 yılında Gessard tarafından izole edilmiş ve mavi cerahat etkeni olarak tanımlanmıştır (27). 19.Yüzyılın sonunda insanın hemen hemen tüm anatomik bölgelerinden infeksiyon etkeni olarak izole edilmiş, kısa bir süre sonra Fraenkel *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonunun klasik tanımını belirlemiştir (18). Son yıllarda hastane infeksiyonu etkeni olarak sıklıkla izole edilmesi, bu bakterinin önemini arttırmıştır.

*Pseudomonas aeruginosa*'nın doğada ve özellikle sulu sistemlerde yaygın bir şekilde yer alması, birçok organik maddeyi metabolize edebilme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. İçerdiği enzim, toksin, pigment gibi ekstraselüler ürünler ve etrafını saran ekzopolisakkarit matriksi, onu bulunduğu çevredeki bakterisit etkilerden korumakta ve uzun süre yaşayabilmesini sağlamaktadır.

Nemli ortamlardaki bu kolay üreyebilme yeteneği ve dezenfektan maddelere karşı direnç göstermesi, hastanede tıbbi girişimler için kullanılan gereçlerin kontamine olmasına ve bunun sonucunda ekzojen kaynaklı hastane infeksiyonlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Özellikle kateterizasyon ve trakeostomi gibi tıbbi girişimlere maruz kalan hastalarda bu risk artmaktadır.

Doğada yaygın bir şekilde bulunan ve bir insan intestinal saprofiti olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın endojen hastane infeksiyonlarına neden olması, konağın savunma mekanizmasını sürekli kontrol ettiğini göstermektedir. Özellikle geniş etki spektrumuna sahip antibiyotiklerin kullanımı floranın doğal dengesini bozmakta ve infeksiyon riskini arttırmaktadır.

Bir diğ er faktör, sitotoksik etkili ilaçlar veya radyasyon uygulanımı sonucunda hastanın immün sisteminin baskılanması veya kişide kistik fibroz, nötropeni gibi immünolojik savunma mekanizmasını zayıflatıcı etkenlerin varlığıdır.

Pseudomonas aeruginosa'nın direnç gösterdiği antibiyotiklerin gün geçtikçe artış göstermesi, etkeni olduğu infeksiyonların tedavisinde güçlük çıkartmaktadır. Bu amaçla endokardit ve septisemi vakalarında veya özellikle nötropeni gibi immün sistemi baskılanmış kişilerde oluşan Pseudomonas aeruginosa infeksiyonlarının tedavisinde antibiyotiklerin kombinasyon halinde oluşturdukları sinerjist etkiden yararlanılmaktadır. Antibiyotiklerin kombinasyon halinde kullanımı genellikle infeksiyon etkeni bilinmediğinde veya infeksiyona neden olan suşların sayısı birden fazla ise antibiyotiklerin etki spektrumunu genişletmek, bakterisit etkilerini arttırmak veya hızlandırmak ve suşların antibiyotiklere direnç kazanmalarını önlemek amacıyla uygulanmaktadır. Bir diğ er faktör, antibiyotikler arasındaki sinerjist etkiden yararlanarak daha düşük dozda uygulamaları sonucu toksisite olasılığını azaltmaktadır.

Bu amaçla ciddi Pseudomonas aeruginosa infeksiyonlarının tedavisinde direnç gelişimini önlemek ve olası mikst infeksiyonların varlığında geniş etki spektrumunu elde etmek için tedavide beta laktam grubu antibiyotikler ile aminoglikozit grubu antibiyotiklerin kombinasyon halinde kullanımından yararlanılmaktadır. Bu iki antibiyotik grubunun kombinasyon halinde Pseudomonas aeruginosa üzerinde sinerjist etkisi, beta laktam grubu antibiyotiklerin bakteri hücre duvarı sentezini inhibe etmesi sonucu aminoglikozitlerin intraselüler konsantrasyonunu arttırmasıyla gerçekleşmektedir.

Tedavide kullanılan antibiyotik kombinasyonunun infeksiyon etkeni olan suşa karşı etkinliğinin saptanması ancak kantitatif yöntemlerle belirlenmektedir. Bu nedenle çalışmamızda

birçok araştırmacı tarafından tercih edilen mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemi kullanılmıştır.



## GENEL BİLGİLER

*Pseudomonas aeruginosa* doğada yaygın olarak; özellikle deniz suyunda, tatlı su kaynaklarında ve bitki yüzeylerinde bulunan bir mikroorganizmadır. Ancak bu bakteriye patojen potansiyelliğini veren, yaygın bulunuşundan çok doğal ekolojik sistemdeki üreme şeklidir. Elektron mikroskopuyla yapılan incelemeler, bakterinin doğada serbest değil de bulunduğu sisteme yapışık bir ekzopolisakkarit matriksin içinde mikrokoloniler halinde ürediğini göstermektedir. Bu şekilde bulunduğundan dolayı ortamdaki diğer bakterisidal etkilerden korunmaktadır (17).

Normal insan dışkıсында % 10 civarında bulunan *P.aeruginosa*'nın hastanede yatan hastalar üzerinde yapılan araştırmalarda, gastrointestinal bölgeye yerleşme oranının % 20-30 civarında ve bazen % 54'ü geçtiği bildirilmiştir. Sağlıklı kişiler tarafından tüketilen besin maddeleriyle alınan *P.aeruginosa* herhangi bir hastalık oluşturmaksızın dört gün içerisinde dışkıyla atılmasına rağmen hastanede yatan hastaların gastrointestinal bölgelerine yerleşme oranının yüksek olmasının başlıca nedenlerinden bazıları hastaların geniş etki spektrumuna sahip antibiyotiklerle tedavi görmesi, kontaminasyon olasılığının yüksek olduğu kurum yemeğini tüketmesi ve virulan suşlara maruz kalma olasılığının fazla olmasıdır (63).

Birçok araştırmacı ve kurumlarca yapılan araştırmalar *P.aeruginosa*'nın gün geçtikçe daha sık hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edildiğini göstermektedir (2, 3, 10, 12, 19, 77). Bunun başlıca nedenleri *P.aeruginosa*'nın kuruluğa duyarlı olmasına rağmen suda aylarca yaşayabilmesi, basit beslenme gereksinimine ve birçok organik maddeyi metabolize

etme yeteneğine sahip olması, birçok antibiyotiğe ve dezenfektan maddeye direnç göstermesidir (63, 74). Genellikle hastane ortamındaki nemli yerlerde bulunduğundan ekzojen hastane infeksiyonlarının başlıca etkenidir. Bunlar her tür alanda kullanılan su, süs bitkisi, vazo suyu, traş fırçaları, temizlik fırçaları, yer bezleri, el havluları, süngerler, sürgü, idrar torbaları, tuvalet, lavabo, musluk, tedavi havuzları, el kremi, vücut losyonları, oral termometreler, yıkama makinaları, besin maddeleri, klima cihazları, iyon değiştirici reçineler, dezenfektan ve antiseptik maddeler gibi genel kullanımda yararlanılan gereçler yoluyla veya dezenfekte edilmiş her tür kateter, yara drenleri, solunum ventilatörleri, inkübatörler, diyaliz cihazları, diyaliz sıvıları, infüzyon sıvıları, göz damlaları, endoskoplár, nebulizörler, emme aletleri, şırıngalar, forseps ve endoskopide yara, kulak, böbreklerin yıkanması için kullanılan su ve çözeltiler gibi tıbbi müdahale için yararlanılan gereçler yoluyla yayılmaktadır (12, 32). Hastanede P.aeruginosa infeksiyonlarının en önemli kaynaklarından biri insandır. Infekte yara, idrar ve eksuda oluşmuş lezyonlar gibi nemli kaynaklar aracılığıyla sargı bezleri, hasta giyisileri, yatak çarşafı ve diğer eşyaların kontamine olması sonucu infeksiyon etkeninin hastane personelinin ve ziyaretçilerin elleriyle diğer hastalara taşınmasına neden olmaktadır (32).

Ciddi P.aeruginosa infeksiyonlarına immün sistemi normal olan kişilerde çok ender rastlanılmaktadır. Konak, P.aeruginosa'ya karşı kendisini öncelikle epitel bariyeri daha sonra hümmoral bağışıklığı, kompleman sistemi, nötrofiller ve makrofajlar gibi fagositik hücreleri ve hümmesel bağışıklığıyla savunur (61).

İnfeksiyonun başlayabilmesi için P.aeruginosa'nın mukoza yüzeyine yapışması gerekmektedir. Epitel hücrelerin bütünlüğü ve IgA gibi salgısal immünglobulinler bu olayı engellemektedir. Mikroorganizmanın epitel hümmesine yapışması aralarında-



ki özel tanıma sistemleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Epitel hücrelerinin sialik asit içeren glikolipid yapıdaki reseptörlerine *P.aeruginosa*'nın bağlanma eğilimi vardır (62). *Pseudomonas aeruginosa*'nın polar pili yapıdaki yüzeyi de bu yapışma işlemine aracı olmaktadır. Konağın epitel yüzeyinin değişikliğe uğraması, *P.aeruginosa*'nın yapışmasına izin vermekte ve bunun hızlı bir kolonizasyonun takip etmesine neden olmaktadır. Doğal mikrobiyolojik floranın geniş etki spektrumuna sahip antibiyotiklerce baskılanması, hastanın kateterizasyon veya ventilatör desteğine maruz kalması, sitotoksik etkili ilaçlarla tedavi görmesi, kistik fibrozlu oluşu, deride yanık veya lezyonların ve nötropeni gibi bir immün yetmezliğin bulunması fırsatçı patojen olan *P.aeruginosa*'nın kolonizasyonuna neden olmaktadır.

Patojen bir mikroorganizma mukoza yüzeyine bir kez yapışıp infeksiyonu başlattığında, devamlılığını sağlamak için demire ihtiyaç göstermektedir. Bunun için mikroorganizmanın, konağın nonspesifik savunma mekanizmalarından biri olan laktoferrin ve transferrin gibi demiri bağlayan proteinlerdeki demirle rekabete girebilecek bir sisteme sahip olması gerekmektedir. Birçok mikroorganizma, hücreler tarafından alınan ve siderofor denilen  $Fe^{3+}$  iyonu ile kompleks halinde bulunan oldukça spesifik demir kelatörlerini salgılamaktadır. Bazı bakterilerde bu demir-siderofor kompleksi için reseptör bulunmakta ve ferrisideroforu kendisine bağlayarak, demiri kelatörden redüktif ayrışmaya uğratmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*'nın en spesifik sideroforlarından biri pyochelindir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın demir iyonlarına gereksinimi olduğunda, dış membranda ferripyochelini bağlayan protein yüksek konsantrasyonda üretilmekte ve böylece konağın demiri kısıtlayıcı nonspesifik savunma mekanizmasını yenebilmektedir (76). *Pseudomonas aeruginosa*, ayrıca lokal antikorlara karşı kendisini savunabilecek özelliklere sahiptir. Döring ve arkadaşları (22), mikroorganizmanın devamlılığını sağlayabilmesi için

*P.aeruginosa* proteazlarının immünglobulinleri parçalayarak konağın savunma sistemini hasara uğrattığını göstermişlerdir. Bu proteazlar konağın polimorf nükleuslu lökositlerini etkileyerek kemotaksiyi önlemekte ve bakterinin ürettiği lökositin de bu hücrelere karşı etkili olmaktadır. Ferrisideroforlar, proteolitik enzimler ve lökositin gibi virulans faktörlerinin yanında içerdiği yüksek molekül ağırlıklı polisakkarit yüzey antijenleri ile mükoid suşları fagositoza karşı ko-ruyan aljinatı *P.aeruginosa*'nın mukoza yüzeyine yerleşmesine ve bakterinin çoğalmasını sağlamaktadırlar.

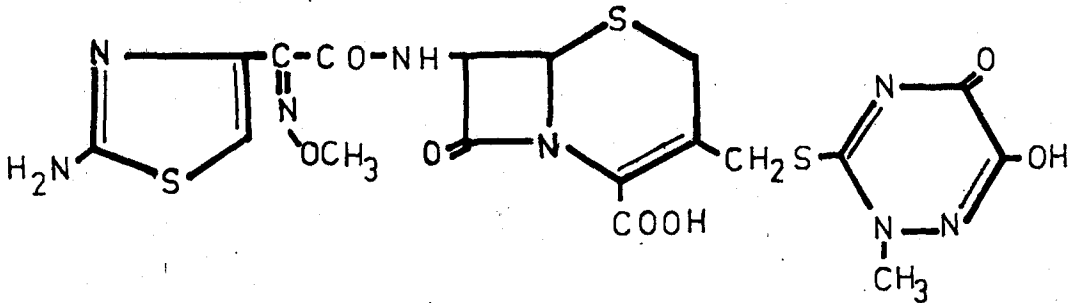
Konağa ait doku harabiyeti, *P.aeruginosa*'nın ekstraselüler ürünleri ile veya konağın bu ürünlere karşı göstermiş olduğu aşırı duyarlık yanıtıyla oluşmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*'nın patojenitesine, oluşturduğu proteazlar, fosfolipaz C, glikolipid, ekzotoksin A, ekzoenzim S, alkalın proteaz, elastaz, alkalın fosfataz ve aljinat gibi ekstraselüler ürünler katkıda bulunmaktadır (22). Oluşturduğu lipopolisakkarit ve pigmentlerin ise hastalığa neden olacak derecede toksik etkileri yoktur.

Hemolitik aktiviteye sahip olan glikolipid ve fosfolipaz C (lesitinaz) daha çok lokal etkiye sahip olmakta ve kistik fibrozlu hastaların solunum yollarının kolonizasyonunda rol oynamaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*'nın oluşturduğu alkalın proteaz ve elastaz kornea ve akciğer dokularını hasara uğratmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, proteazların oluşturduğu immün komplekslerin akciğerlere ve korneadaki endojen proteazların serbest bırakılmasını uyararak gözlere indirekt olarak zarar verdiğini göstermektedir. Ekzotoksin A çok düşük dozlarda fare, tavşan, köpek ve rhesus maymunları için öldürücü olup, duyarlı hücrelerde protein sentezini inhibe ederek toksik etkisini oluşturmaktadır. Ekzotoksin A özellikle kornea, yanık yara ve akciğer infeksiyonlarında önemli bir virulans faktörüdür. Ekzoenzim S'in infeksiyonlardaki rolü tam

olarak bilinmemekle birlikte ekzotoksin A ile birlikte bulunduğu hastalarda mortaliteyi arttırdığı ve *P.aeruginosa*'nın etken olduğu kronik akciğer infeksiyonlarında önemli bir rolü olduğu bildirilmektedir (76). *Pseudomonas aeruginosa* bir kez infeksiyonu başlattıktan sonra, sahip olduğu bu özelliklerinden dolayı konağın savunma mekanizmalarına ve antibiyotiklere karşı güçlü bir direnç göstermektedir. Ancak bir infeksiyonun başlayabilmesi için öncelikle deri veya mukozanın epitel bariyerinin hasar görmesi veya konakta bir immün yetmezliğin bulunması gerekmektedir.

*Pseudomonas aeruginosa*'nın etken olduğu infeksiyonların tedavisinde etkili antibiyotiklerin seçimi önemlidir. Antibiyotiklerin Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkileri, bakterideki hedeflerine ulaşabilmek için geçirgenlik bariyerini geçebilme yeteneğine, inaktive edici enzimlere direnç göstermesine, hedeflerine ilgisine ve aktivite göstermesine bağlıdır (78).

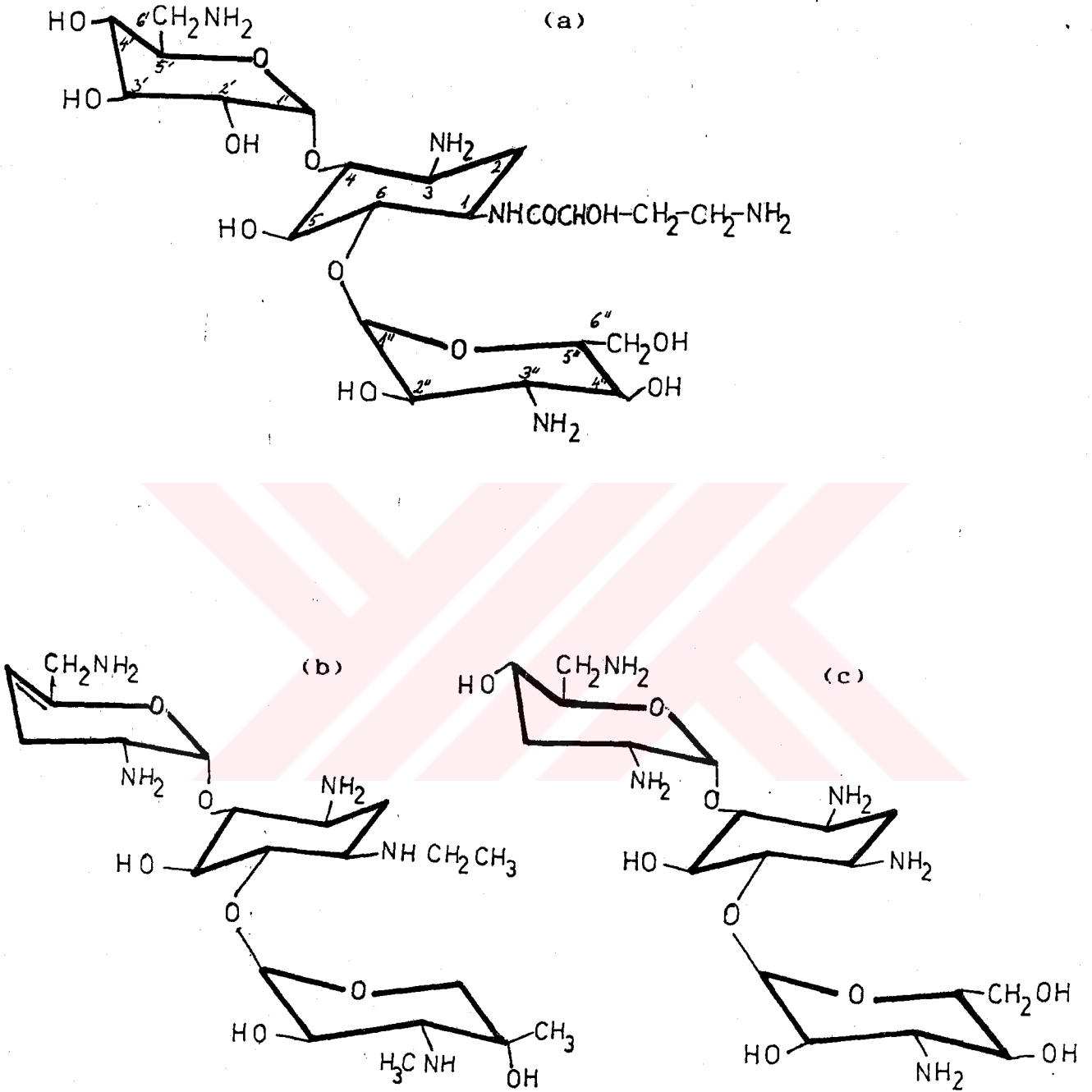
Bir üçüncü kuşak sefalosporin olan seftriakson içerdiği aminotiazolil metoksiimino yan dalı nedeniyle oldukça geniş bir etki spektrumuna sahiptir (Şekil 1).



Şekil 1. Seftriaksonun kimyasal yapısı

Seftriakson  $\alpha$ -hemolitik ve nonhemolitik streptokoklara, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, özellikle *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N.meningitidis* ve *Enterobacteriaceae*'deki suşların birçoğuna etkilidir, ancak *P.aeruginosa*'ya karşı önemli bir etkisi yoktur (48, 57, 59). Beta laktam grubu antibiyotiklerin etki mekanizması üremekte olan bakterinin penisilin bağlayan proteinlerine (PBP) bağlanarak hücre duvarındaki peptidoglikan sentezini çapraz bağların oluşum safhasında inhibe etme esasına dayanır. Bakterideki hidrolazların olaya katılması sonucu peptidoglikan molekülündeki çapraz peptid bağlar hidrolize olur ve gelişen hücre, hücre duvarı örgüsünü kaybederek ölür (73). Seftriaksonun bir diğer özelliği serum yarılanma süresinin uzun oluşu (8 saat) , plazmit ve kromozom tarafından kodlanan beta laktamazlara direnç göstermesidir. Seftriakson bakteri kromozomu tarafından kodlanan sefalosporinazları indükleyerek çok fazla miktarda üretimine neden olduğunda enzim tarafından hidrolize edilmez. Ancak fazla miktardaki enzim seftriakson ile birleşerek antibiyotiğin konfigürasyonunu bozar, bunun sonucunda PBP'e ulaşmasını ve peptidoglikan sentezini durdurmasını engeller (33, 73).

Aminoglikozit grubu antibiyotiklerden amikasin, netilmisin ve tobramisin içerdikleri 2-deoksistreptamin halkasından dolayı *Enterobacteriaceae*'deki suşlara ve özellikle *P.aeruginosa* suşlarına etkilidirler (21, 24, 29, 54, 65, 68, 69). Amikasin, deoksistreptaminin 1 pozisyonuna bir 2-hidroksi-4-aminobutiril yan dalının asetillenmesiyle Kanamisin A'dan türetilerek; netilmisin, sisomisinin deoksistreptamin halkasının 1-N pozisyonuna bir etil grubunun ilavesiyle elde edilmiş; tobramisin ise *Streptomyces tenebrarius*'un ürünü olan nebramisinin antibiyotik kompleksi faktörlerinden biridir (51) (Şekil 2).



(a) Amikasin (b) Netilmisin (c) Tobramisin

Şekil 2. Aminoglikozitlerin kimyasal yapısı

Aminoglikozitlerin etki mekanizması üç aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşamada katyonik yapıdaki aminoglikozit negatif yüklü bakteri yüzeyine bağlandıktan sonra büyük bir kısmı porin proteinlerinden geçerek sitoplazma zarına ulaşır ve burada bulunan fosfolipidlerin fosfat kısımlarına ve solunum kinonlarına iyonik olarak bağlanır. Bunu enerjiye gereksinim gösteren iki aşama izler. Aminoglikozitlerin sitoplazmaya girebilmesi için gerekli elektron transportunu transporter olan kinonlar sağlar (15). Yeterli miktardaki aminoglikozit sitoplazma zarında bulunan transporter ile birleştikten sonra, transporterler redüksiyona uğrayarak negatif polarite oluşturur. Membran potansiyeli bu şekilde optimum düzeye ulaşarak aminoglikozitler sitoplazma zarından sitoplazmaya geçirilir. Aminoglikozitlerin ribozomdaki hedeflerine bağlanmasıyla ve potasyum iyonlarının kaybolması sonucu elektronegatiflik artar ve antibiyotiklerin sitoplazmaya girişi hızlanır. Sitoplazmada yeterli miktarda biriken aminoglikozitin ribozomun 30 S alt ünitelerindeki spesifik reseptörlerine dönüşümsüz bir şekilde bağlanması m-RNA'nın şifreyi yanlış okumasına ve hatalı aminoasitlerin peptide girmesine neden olur. Bunun sonucunda işlevi olmayan proteinlerin üretimine yol açarak bakterinin ölümüne neden olur (14, 51).

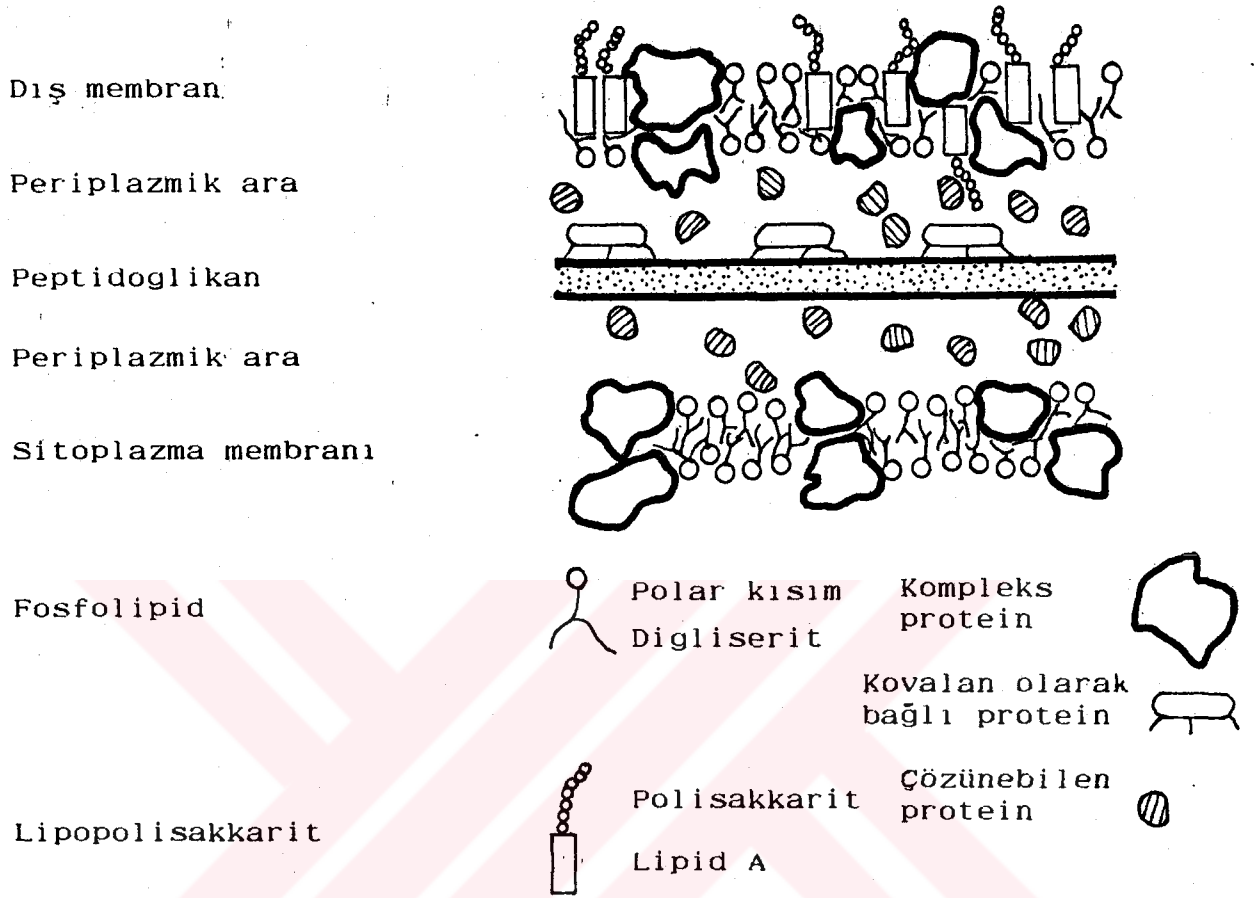
Aminoglikozitlere karşı direnç, hedef aldığı bakteriyel kromozomun değişikliğe uğraması, bakteriye ait enzimlerce inaktive edilmesi ve hücre duvarı geçirgenliğinin azalması olmak üzere üç şekilde gerçekleşebilir (67).

Amikasin, netilmisin ve tobramisin içerdikleri 2-deoksi-streptamin halkasından dolayı bakteri kromozomu alt ünitelerinde birçok bölgeye bağlanma yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle kromozomun değişikliğe uğramasına bağlı direnç çok ender görülmektedir (54).

Aminoglikozitleri modifiye eden enzimler plazmitler tarafından kodlanmakta ve etkilerine göre asetiltransferazlar

(AAC), fosforilazlar (APH) ve nukleotidil transferazlar veya adenil transferazlar (ANT veya AAD) olmak üzere üç grupta toplanır (71). Bu enzimler amino gruplarını asetilleyerek, hidroksil gruplarını fosforilasyon veya adenilasyona uğratarak antibiyotiği modifiye ederler. Bakterinin sitoplazma zarında veya periplazmik aralığında bulunan bu enzimler aminoglikozitlerin bir kısmını modifiye ederek antibiyotiğin sitoplazmaya girişi için gerekli olan elektron transport sistemini işlemez hale getirirler. Böylece sitoplazmada ribozomların alt ünitelerine bağlanmak için gerekli olan yeterli miktarda antibiyotiğin birikimi engellenmiş olur (1, 72). Son yıllarda yapılan çalışmalar aminoglikozitleri inaktive eden birçok enzimin bulunduğunu göstermektedir. Buna göre tobramisin AAC (3), AAC (3)I, AAC (3)II, AAC (6'), AAC (2'), AAD (3) AAD (4'), AAD (2"); netilmisin AAC (3), AAC (3)II, AAC (6'), AAC (2'); amikasin AAC (6') ve AAD (4') enzimleri tarafından inaktive edildiği bildirilmiştir (20, 54). Araştırmalara göre *P.aeruginosa*'da AAC (3), AAC (3)II, AAC (6') ve AAD (2") enzimlerinin varlığı göz önüne alındığında, amikasinin sadece AAC (6') enzimi ile inaktive olması bu antibiyotiğin diğer aminoglikozitlere direnç gösteren *P.aeruginosa* suşlarına karşı etkili olduğunu göstermektedir (5, 20, 28, 29, 53, 67). Amikasin, sahip olduğu bu özelliğini içerdiği 2-hidroksi-4-aminobutiril yan dalından kaynaklanmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*'nın inaktive edici enzimlerine karşı direnç gösteren amikasini, taşıdığı etil grubu aracılığıyla netilmisin izlemektedir.

Hücre duvarı geçirgenliğinin azalmasına bağlı direnç özellikle *P.aeruginosa* infeksiyonlarında önem kazanmaktadır. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı kompleks bir yapı göstermektedir. Hücre duvarındaki ince peptidoglikan tabakanın dışında lipopolisakkarit (LPS) ve fosfolipid içeren bir tabaka, iç kısmında fosfolipid yapıda bir sitoplazma zarı bulunmaktadır (64) (Şekil 3).



Şekil 3. Gram negatif bakterinin yüzey tabakaları

Hidrofilik antibiyotikler hidrofob yapıdaki dış membrandan ancak porin proteinlerinin oluşturduğu su dolu kanallardan geçerek bakterideki hedeflerine ulaşabilirler. *Pseudomonas aeruginosa*'da bunu sağlayan porin proteini F proteini'dir. Ancak bir hücrede bulunan F proteinlerinin sayısı 200.000 civarında olmasına rağmen, bunların % 1'inden daha azı aktif bir kanal olarak iş görür. Bu fonksiyonel F proteinlerinin sayısını peptidoglikan ve LPS ile trimer oluşturan F proteinlerine nonkovalan bir şekilde bağlanan LPS molekülü tayin eder (35).



Aminoglikozitlerin *P.aeruginosa*'nın dış membranından geçebilmek için izledikleri bir diğer yol polikatyonik yapılarından kaynaklanmaktadır. Aminoglikozitler gibi polikatyonik yapıdaki antibiyotikler *P.aeruginosa*'nın dış membranında bulunan iki değerli katyonların bağlanma yerleriyle etkileşime girme özelliğine sahiptirler (36). Aminoglikozitler, LPS molekülleri arasında çapraz köprüler kuran  $Mg^{2+}$  iyonunun yerine geçerek *P.aeruginosa* dış membranının bütünlüğünü bozarlar. Bu şekilde kolayca hücre içine girerek bakterideki hedeflerine ulaşırlar (55). Ancak bu özelliğinden dolayı, *P.aeruginosa*'nın antibiyotiklere karşı in vitro duyarlılığının araştırıldığı çalışmalarda fizyolojik koşulları sağlamak amacıyla deneyde kullanılan besiyerine  $Mg^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  gibi iki değerli katyonların ilave edilmesi gerekmektedir (24, 29, 43, 45).

## G E R E Ç V E Y Ö N T E M

Çalışmamızda İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın rutin laboratuvarlarında incelenen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 adet Pseudomonas aeruginosa suşu kullanılmıştır. Bu suşların 36'sı idrardan, 6'sı cerrahatten, 6'sı boğaz salgısından, 2'si kulak salgısından izole edilmiştir.

### 1. Kullanılan antibiyotikler ve çözeltileri

Çalışmada kullanılan antibiyotiklerden seftriakson F. Hoffman-La Roche & Co (aktivitesi 980 µg/mg), amikasin ve netilmisin Eczacıbaşı İlaç San.Tic.A.Ş. (amikasinin aktivitesi 989 µg/mg, netilmisinin aktivitesi 670 µg/mg) ve tobramisin Mustafa Nevzat İlaç Sanayinden (aktivitesi 976 µg/mg) temin edilmiştir.

Antibiyotiklerin stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bunun için aşağıdaki formülden yararlanılmıştır.

$$\text{Tartılacak antibiyotik miktarı (mg)} = \frac{\text{Çözücünün hacmi (ml)} \times \text{İstenen konsantrasyon (µg/ml)}}{\text{Antibiyotiğin aktivitesi (µg/mg)}}$$

Antibiyotiklerin herbirinden uygun miktarda Mettler H72 terazisinde tartıldıktan sonra, steril damıtık suda çözüldürülerek 2000 µg/ml'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler bir hafta içinde deneylerde kullanılmış ve bu süre içinde -20°C'den daha düşük ısıda saklanmıştır (7, 8).

### 2. Kullanılan besiyerleri

#### 2.1. Mueller Hinton Buyyonu (Difco)

Bu besiyerini hazırlamak için toz haldeki Mueller Hinton buyyonundan 21 g tartılmış, üzerine 1000 ml damıtık su ilave

edilmiş, maddeler çözüldürüldükten sonra Erlen Meyer şişelerine 200 ml miktarlarda dağıtılmış, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Hazırlanan bu besiyerine iki değerli katyonlar olan kalsiyum ve magnezyum tuzlarının çözeltileri ilave edilmiştir. Bunun için  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  ve  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 'un 10 mg/ml'lik çözeltileri hazırlanıp membran filtre tekniğiyle (Sartorius 0.2  $\mu m$ ) steril edilmiştir. Mueller Hinton buyyonuna magnezyum iyonlarını içeren steril çözeltiden 25 mg/l; kalsiyum iyonlarını içeren steril çözeltiden ise 50 mg/l olacak şekilde ilave edilmiştir.

### 2.2. Triptik Soya Buyyonu (Difco)

Toz haldeki triptik soya buyyonundan 30 g tartılarak üzerine 1000 ml damıtık su ilave edilmiş, maddeler çözüldürüldükten sonra tüplere 5 ml miktarlarda dağıtılmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika bekletilerek steril edilmiştir.

### 2.3. Triptik Soya Agar (Difco)

Toz halindeki triptik soya agardan 40 g tartılarak üzerine 1000 ml damıtık su ilave edilmiş, çözüldürüldükten sonra tüplere 15 ml miktarlarda dağıtılarak otoklavda 121°C'de 15 dakika tutularak steril edilmiştir.

## 3. Bakteri suşlarının kontrolü

Çalışmada kullanılacak bakteri suşları deneylere başlanmadan önce kontrol edilmiştir. Bunun için incelenecek bakterinin eğik jeloz besiyerindeki kültüründen iğne ucu ile az miktarda bakteri alınmış ve 5 ml buyyonda süspansiyonu yapılmıştır. Bu süspansiyondan petri kutusundaki jeloz besiyerine azaletma yöntemiyle ekim yapılmış, 37°C'de bir gece inkübe edilen petri kutularındaki jeloz üzerinde oluşan kolonilerin birinden alınarak eğik jeloz besiyerine ekilmiştir.

Elde edilen saf kültür;

. Mikroskopta morfolojik özellikleri Gram negatif çomak yönünden ve lam lamel arası preparasyon hazırlanarak hareket

. Kültür özellikleri koloninin sarı-yeşil rengi, şekli, kokusu  
. Biyokimyasal özellikleri oksidasyon-fermentasyon, oksidaz,  
katalaz, piyosiyanın pigmenti oluşturma  
yönünden incelenerek *Pseudomonas aeruginosa* olduğu doğrulan-  
mıştır.

#### 4. İnokulum hazırlanması

##### 4.1. McFarland standardının hazırlanması

Çalışmada 0.5 McFarland'ın standart bulanıklığı esas alınmıştır. Bunu hazırlamak için 0.5 ml 0.048 M  $BaCl_2$  çözeltisi ( $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ 'nun % 1.175'lik çözeltisi a/h) 99.5 ml 0.18 M  $H_2SO_4$  çözeltisine ( $H_2SO_4$ 'in % 1'lik çözeltisi h/h) ilave edilmiştir.

##### 4.2. Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması

Çalışmada kullanılacak *P.aeruginosa* suşlarının eğik triptik soya agar besiyerindeki kültürleri petri kutusundaki triptik soya agar besiyerine azaltma yöntemi ile yayılmış, 37°C'de bir gecelik inkübasyondan sonra oluşan 3-4 koloniden içinde 5 ml triptik soya buyyonu bulunan tüplere ekim yapılmıştır. Ekim yapılan tüpler 37°C'lik etüvde bir gece bekletildikten sonra, bulanıklığı steril damıtık su ile 0.5 McFarland standardına göre ayarlanarak *P.aeruginosa* suşlarının  $10^8$  CFU/ml'lik süspansiyonları elde edilmiştir. Bu süspansiyonlar 2.1 kısmında bildirilen katyon ilave edilmiş Mueller Hinton buyyonunda 1/100 oranında seyreltilerek  $10^6$  CFU/ml'lik süspansiyonları hazırlanmıştır.

#### 5. Diğer malzemeler

Çalışmada U tabanlı 96 kuyu içeren mikroplaklar kullanılmıştır. Bunların sterilizasyonu etilen oksit ile yapılmıştır.

Bu araştırmada antibiyotik çözeltilerinin ve bakteri süspansiyonlarının mikroplaklara uygulanması sekiz kanallı pipetör (Socorex 851) yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Pipetöre ait plastik uçların sterilizasyonu otoklavda 121°C'de 15 dakikada yapılmıştır.

## 6. Minimal inhibitör konsantrasyonunun (MİK) saptanması

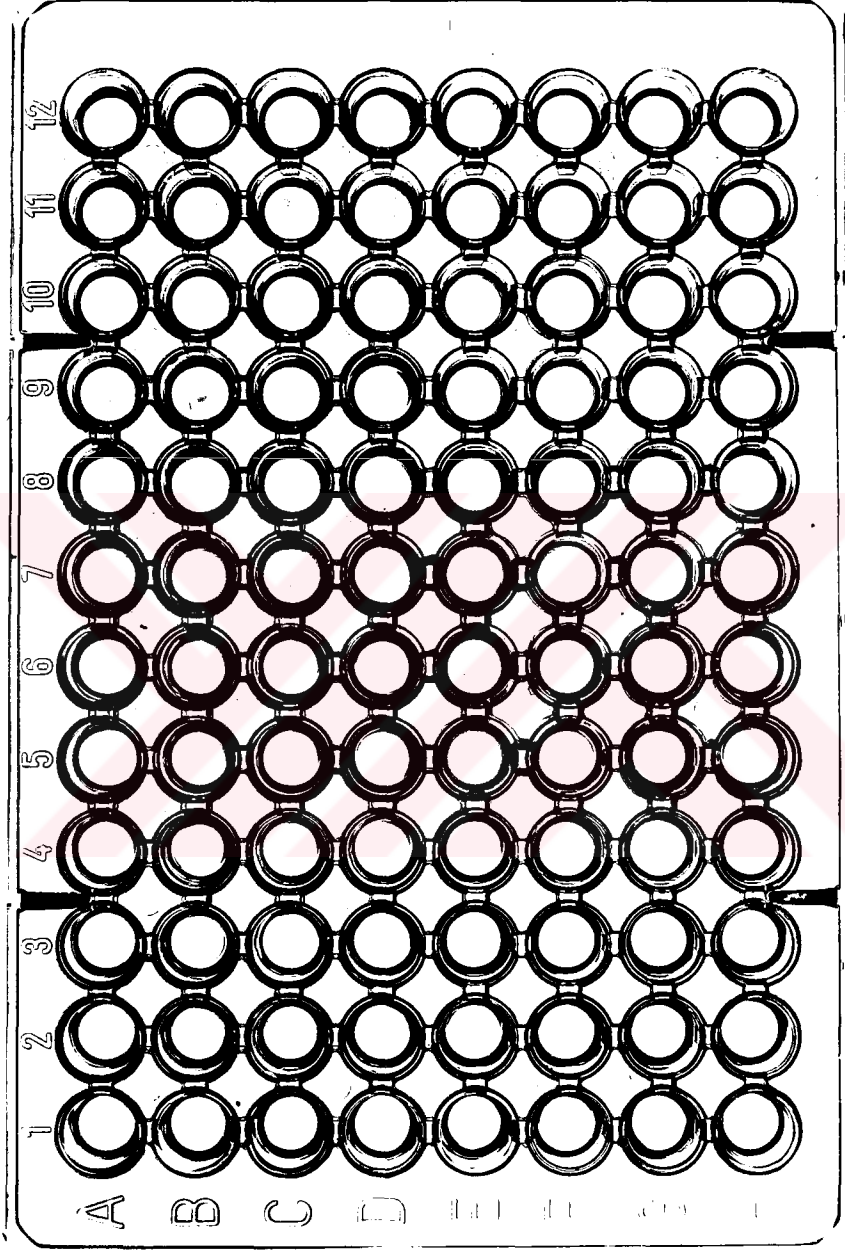
### 6.1. Deney koşullarının standardizasyonu

Çalışmada uygulanan yöntemin uluslararası standartlara uygunluğunu saptamak amacıyla *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır (8, 70). Bu amaçla mikrodilüsyon yöntemi ile seftriaksonun 256-0.25 µg/ml, amikasin, netilmisin ve tobramisinin 128-0.125 µg/ml arasındaki konsantrasyonları 2.1 kısmında hazırlanışı bildirilen katyon ilave edilmiş Mueller Hinton buyyonunda bir seri dilüsyonla elde edilmiştir. Daha sonra 4.2 kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanan *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşunun süspansiyonundan ilave edilmiş, mikroplağın üzeri steril plastik kapağı ile kapatılarak 37°C'de 16-20 saat inkübasyona bırakılmış, üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon (MİK) saptanmıştır.

### 6.2. Deneyde kullanılan antibiyotiklerin MİK değerinin saptanması

Çalışmada mikrodilüsyon yöntemiyle 50 adet *P.aeruginosa* suşuna karşı seftriakson, amikasin, netilmisin ve tobramisinin MİK değerleri araştırılmıştır.

Mikrodilüsyon yöntemiyle antibiyotiklerin MİK değerlerini saptamak için mikroplağın 1 numaralı kolondakilerin dışında kalan her kuyusuna 50'şer µl 2.1 kısmında hazırlanışı bildirilen katyon ilave edilmiş Mueller Hinton buyyonundan konmuş, sonra 1 ve 2 numaralı kolonlara antibiyotiklerin katyon ilave edilmiş Mueller Hinton buyyonundaki son konsantrasyonunun iki misli konsantrasyondaki çözeltilerinden 50'şer µl ilave edilerek 2-11 numaralı kuyular arasında bir seri dilüsyon yapılmıştır. Bundan sonra mikroplağın A kolonundaki 12 numaralı kuyu dışında kalan tüm kuyularına, hazırlanışı 4.2 kısmında bildirilen bakteri süspansiyonundan 50'şer µl konularak 1-11 numaralı kuyularda antibiyotik çözeltileri gerekli konsantrasyonlara ulaşmıştır. Bu konsantrasyonlar seftriakson için 256-0.25 µg/ml; amikasin, netilmisin ve tobramisinin için 128-0.125 µg/ml değerleri arasında olacak şekilde yapılmıştır. A kolonunun 12 numaralı kuyusu besiyerinin sterilite; mikroplaktaki diğer tüm 12 numaralı kuyular ise deneyde kullanılan suşların üremesinin kontrolü için kullanılmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. Mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerinin saptanması

Ekim yapılan mikroplakların üzeri steril plastik bir kapla örtülmüş, buharlaşmayı önlemek amacıyla bir naylon kılıf içine yerleştirildikten sonra etüvde 37°C'de 16-20 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün üremenin gözle görülmediği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

## 7. Mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemiyle antibiyotiklerin kombinasyon halinde etkilerinin saptanması

### 7.1. Antibiyotik kombinasyonlarının standart suşa karşı etkilerinin araştırılması

Bunun için P.aeruginosa ATCC 27853 standart suşuna karşı seftriaksonun amikasin, netilmisin ve tobramisin ile olan kombinasyonlarının etkisi 7.2 kısmında bildirildiği şekilde saptanmıştır.

### 7.2. Antibiyotik kombinasyonlarının P.aeruginosa suşlarına karşı etkilerinin araştırılması

"Checkerboard" yönteminin esası, dikey düzlemde antibiyotiğin denenen suşa karşı saptanan MİK değerinin iki katı konsantrasyondaki çözeltileri bir seri kuyu içinde yukarıdan aşağıya doğru antibiyotiğin MİK değerinin dört dilüsyon altına kadar; yatay düzlemde ise çalışmada kullanılan diğer antibiyotiğin aynı suşa karşı saptanan MİK değerinin iki katı konsantrasyondaki çözeltileri bir seri kuyu içinde sağdan sola doğru antibiyotiğin MİK değerinin dört dilüsyon altına kadar seyreltilerek her kuyuda her iki antibiyotiğin farklı konsantrasyondaki çözeltilerini içeren kombinasyonlarının elde edilmesidir (49).

Bu çalışmada dikey düzlemde seftriakson, yatay düzlemde amikasin, netilmisin veya tobramisinden biri yukarıda açıklanan "checkerboard" yöntemine göre mikroplaktaki kuyulara uygulanarak iki antibiyotiğin farklı kombinasyonlarının 50 adet P.aeruginosa suşuna karşı etkisi denenmiştir (Şekil 5).

Seftriakson		1	2	3	4	5	6	7	
$\mu\text{g/ml}$	16	A	$\frac{16}{0}$				$\frac{16}{4}$	$\frac{16}{8}$	
	<input checked="" type="checkbox"/> 8	B	$\frac{8}{0}$			$\frac{8}{2}$			
	4	C							
	2	D	$\frac{2}{0}$		$\frac{2}{1}$				
	1	E							
	0.5	F		$\frac{0.5}{0.25}$					
	0	G					$\frac{0}{4}$		
			0	0.25	0.5	1	2	<input checked="" type="checkbox"/> 4	8

Amikasin  $\mu\text{g/ml}$

Antibiyotiğin MİK değeri

Şekil 5. "Checkerboard" yöntemiyle iki antibiyotiğin kombinasyon halinde denenen konsantrasyonları

Bunun için antibiyotiklerin deneyde kullanılacak konsantrasyonları 2.1 kısımda hazırlanışı bildirilen katyon ilave edilmiş Mueller Hinton buyyonunda hazırlanmış ve daha sonra mikroplaktaki kuyulara her iki antibiyotiğin bu çözeltilerinden 25'şer  $\mu\text{l}$  ve deneyde kullanılan bakterinin 4.2 kısımda bildirildiği şekilde hazırlanan süspansiyonundan 50'şer  $\mu\text{l}$  konarak her kuyuda 100  $\mu\text{l}$  hacimde karışım elde edilmiştir. Bir kuyuda iki farklı antibiyotiğin konsantrasyonu bu şekilde dört defa seyrelmiş olacağından, deneyde kullanılan antibiyotik çözeltilerinin gerekli olan son konsantrasyonunun dört misli konsantrasyondaki çözeltileri kullanılmıştır. Buna göre antibiyotiğin suşa karşı saptanan MİK değeri 1  $\mu\text{g/ml}$  ise mikroplağın A veya 7 numaralı kolonunda bulunan kuyulara ilave edilen antibiyotik çözeltilisinin konsantrasyonu 8  $\mu\text{g/ml}$

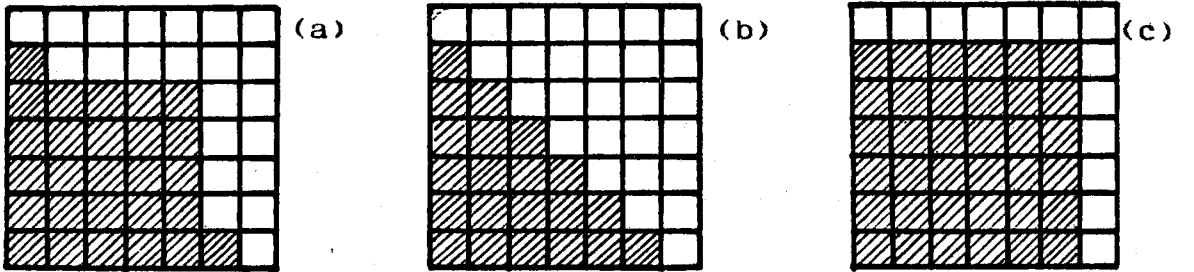


olacak şekilde hazırlanıp uygulanmıştır. Böylece A veya 7 numaralı kolondaki kuyularda denenen suşa karşı antibiyotiğin saptanan MİK değerinin iki katı konsantrasyondaki yani 2 µg/ml'lik çözeltisi elde edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Sıvı besiyerinde "checkerboard" yöntemi için antibiyotik çözeltilerinin seyreltmeleri

Antibiyotik / kuyu		
Son konsantrasyonu (µg/ml)	Stok çözeltinin konsantrasyonu (µg/ml)	Stok çözeltinin hacmi (µl)
0	0	25
0.06	0.25	25
0.125	0.5	25
0.25	1.0	25
0.5	2.0	25
1.0	4.0	25
2.0	8.0	25

Deney esnasında çalışma koşullarının ve besiyerinin sterilite kontrolünü yapmak için her mikroplaktaki bir kuyuya sadece besiyeri konmuştur. Ekim yapılan mikroplakların üzeri steril plastik bir kapakla örtülmüş, buharlaşmayı önlemek amacıyla bir naylon kılıfın içine yerleştirildikten sonra etüvde 37°C de 16-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyondan sonra üremenin görülmediği kuyularda kombinasyon halinde bulunan iki antibiyotiğin konsantrasyonları saptanmıştır (Şekil 6).



(a) Additif (b) Sinerjistik (c) Antagonist

Şekil 6. "Checkerboard" yöntemiyle antibiyotik kombinasyonlarının değerlendirilmesi

Daha sonra saptanan bulgular fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu indeksine (FİK indeksi) göre değerlendirilmiştir (25). Her antibiyotiğin FİK değeri üremenin görülmediği kuyudaki en düşük antibiyotik konsantrasyonunun, antibiyotiğin tek başına aynı suşa karşı etkili olduğu MİK değerine bölünmesiyle elde edilmiştir. FİK indeksi ise, her iki antibiyotiğe ait FİK değerlerinin toplanmasıyla hesaplanmıştır.

$$\frac{A}{MİK_A} + \frac{B}{MİK_B} = FİK_A + FİK_B = FİK \text{ indeksi}$$

A : A antibiyotiğinin B antibiyotiğiyle birlikte üremeyi inhibe ettiği kuyudaki en düşük konsantrasyonu

MİK<sub>A</sub> : A antibiyotiğinin tek başına suşa karşı elde edilen MİK değeri

FİK<sub>A</sub> : A antibiyotiğinin fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu

Aynı terimler B, MİK<sub>B</sub>, FİK<sub>B</sub> için geçerlidir.

Buna göre FİK indeksi  $\leq 0.5$  olan değerler sinerjistik, 1.0 olan değerler additif,  $\geq 2.0$  olan değerler antagonist olarak değerlendirilmiştir.

## B U L G U L A R

### 1. Minimal inhibitör konsantrasyonunun saptanmasına ait bulgular

#### 1.1. Deney koşullarının standardizasyonuna ait bulgular

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşuna karşı mikrodilüsyon yöntemi ile denenen antibiyotiklerin MİK değerlerinin sırasıyla amikasin için 4 µg/ml, netilmisin için 4 µg/ml, tobramisin için 0.5 µg/ml, seftriakson için 8 µg/ml olduğu saptanmıştır. Buna ait sonuçlar Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Antibiyotiklerin standart *P.aeruginosa* suşuna karşı saptanan MİK değerleri

Test mikroorganizma	MİK (µg/ml)			
	Amikasin	Netilmisin	Tobramisin	Seftriakson
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	4	4	0.5	8

#### 1.2. Deneyde kullanılan antibiyotiklerin MİK değerlerine ait bulgular

##### 1.2.1. Seftriaksonun *P.aeruginosa* suşlarına karşı MİK değerlerinin saptanmasına ait bulgular

Deneyde kullanılan çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 50 adet *P.aeruginosa* suşuna karşı seftriaksonun mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değeri sınırları 8-256 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu suşların % 12'sinin seftriaksona duyarlı, % 56'sinin orta duyarlı, % 32'sinin dirençli olduğu gözlenmiştir. Buna ait bulgular Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Seftriaksonun 50 P.aeruginosa suşuna etkisi

Antibiyotik	MİK (µg/ml)			*Duyarlık (%)		
	Sınırları	%50	%90	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Seftriakson	8->256	16	64	12	56	32

\* Duyarlık sınırları: Duyarlı  $\leq 8$  µg/ml, orta duyarlı 16-32 µg/ml, dirençli  $\geq 64$  µg/ml

1.2.2. Amikasinin P.aeruginosa suşlarına karşı MİK değerlerinin saptanmasına ait bulgular

Amikasinin 50 adet P.aeruginosa suşlarının üremesini durduran en düşük konsantrasyon sınırlarının 2-32 µg/ml olduğu ve suşların hiçbirinin amikasine dirençli olmadığı, % 98'inin duyarlı, % 2'sinin orta duyarlı olduğu saptanmıştır. Buna ait bulgular Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Amikasinin 50 P.aeruginosa suşuna etkisi

Antibiyotik	MİK (µg/ml)			*Duyarlık (%)		
	Sınırları	%50	%90	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Amikasin	2-32	4	16	98	2	0

\* Duyarlık sınırları: Duyarlı  $\leq 16$  µg/ml, orta duyarlı 32 µg/ml, dirençli  $\geq 64$  µg/ml

1.2.3. Netilmisinin P.aeruginosa suşlarına karşı MİK değerlerinin saptanmasına ait bulgular

Netilmisinin 50 adet P.aeruginosa suşuna karşı etkili olduğu MİK değerleri sınırlarının 4-64 µg/ml olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu suşların % 54'ünün netilmisine duyarlı, % 26'sinin orta duyarlı, % 20'sinin dirençli olduğu belirlenmiştir. Bunlara ait bulgular Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Netilmisinin 50 P.aeruginosa suşuna etkisi

Antibiyotik	MİK (µg/ml)			*Duyarlık (%)		
	Sınırları	%50	%90	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Netilmisin	4-64	8	32	54	26	20

\* Duyarlık sınırları: Duyarlı  $\leq 8$  µg/ml, orta duyarlı 16 µg/ml, dirençli  $\geq 32$  µg/ml

1.2.4. Tobramisin'in P.aeruginosa suşlarına karşı MİK değerlerinin saptanmasına ait bulgular

Tobramisin'in 50 adet P.aeruginosa suşuna karşı MİK değerleri sınırlarının 0.5-64 µg/ml olduğu ve bu suşların % 86'sının duyarlı, % 14'ünün dirençli olduğu saptanmıştır. Bunlara ait bulgular Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Tobramisin'in 50 P.aeruginosa suşuna etkisi

Antibiyotik	MİK (µg/ml)			*Duyarlık (%)		
	Sınırları	%50	%90	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Tobramisin	0.5-64	1	4	86	0	14

\* Duyarlık sınırları: Duyarlı  $\leq 4$  µg/ml, orta duyarlı 8 µg/ml, dirençli  $\geq 16$  µg/ml

2. Mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemiyle antibiyotiklerin kombinasyon halinde etkilerinin saptanmasına ait bulgular

2.1. Antibiyotik kombinasyonlarının standart suşa karşı etkilerinin saptanmasına ait bulgular

Seftriaksonun amikasin, netilmisin ve tobramisin ile olan üç kombinasyonunun P.aeruginosa ATCC 27853 suşu üzerinde sinerjistik etkili olduğu saptanmıştır. Buna ait bulgular Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Seftriaksonun aminoglikozitlerle olan kombinasyonlarının standart suşa karşı saptanan FİK değerleri

Test mikroorganizma	FİK		
	Amikasin	Netilmisin	Tobramisin
P.aeruginosa ATCC 27853	0.5	0.5	0.5

2.2. Antibiyotik kombinasyonlarının P.aeruginosa suşlarına karşı etkilerinin saptanmasına ait bulgular

2.2.1. Seftriakson-amikasin kombinasyonuna ait bulgular

Bu kombinasyonun, FİK indeksine göre çalışmada kullanılan 50 P.aeruginosa suşundan 43'üne sinerjistik, 7'sine additif etkili olduğu saptanmıştır. Suşların hiçbirine karşı antagonist etki görülmemiştir. Buna ait sonuçlar Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Seftriakson-amikasin kombinasyonunun 50 P.aeruginosa suşuna etkisi

Antibiyotik kombinasyonu	Sinerjistik		Additif		Antagonist	
	FİK <sub>≤</sub> 0.5	%	FİK 1	%	FİK <sub>≥</sub> 2	%
Seftriakson + Amikasin	43	86	7	14	0	0

Seftriakson-amikasin kombinasyonunun "checkerboard" yöntemiyle P.aeruginosa suşları üzerinde oluşturduğu additif etki Şekil 7'de gösterilmiştir.

2.2.2. Seftriakson-netilmisin kombinasyonuna ait bulgular

"Checkerboard" yöntemine göre seftriakson-netilmisin kombinasyonunun çalışmada kullanılan 50 P.aeruginosa suşundan 45'ine sinerjistik, 5'ine additif etkili olduğu FİK indeksine göre saptanmıştır. Bu kombinasyon ile suşların hiçbirine karşı

antagonist etki belirlenmemiştir. Bunlara ait bulgular Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Seftriakson-netilmisin kombinasyonunun 50 P.aeruginosa suşuna etkisi

Antibiyotik kombinasyonu	Sinerjist		Additif		Antagonist	
	FİK <sub>≤</sub> 0.5	%	FİK 1	%	FİK <sub>≥</sub> 2	%
Seftriakson + Netilmisin	45	90	5	10	0	0

### 2.2.3. Seftriakson- tobramisin kombinasyonuna ait bulgular

Bu kombinasyonun 50 P.aeruginosa suşundan 48'ine sinerjist, 2'sine additif etki gösterdiği FİK indeksine göre saptanmıştır. Suşların hiçbirine karşı antagonist etki görülmemiştir. Bunlara ait bulgular Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Seftriakson-tobramisin kombinasyonunun 50 P.aeruginosa suşuna etkisi

Antibiyotik kombinasyonu	Sinerjist		Additif		Antagonist	
	FİK <sub>≤</sub> 0.5	%	FİK 1	%	FİK <sub>≥</sub> 2	%
Seftriakson + Tobramisin	48	96	2	4	0	0

Seftriakson-tobramisin kombinasyonunun "checkerboard" yöntemiyle P.aeruginosa suşları üzerinde oluşturduğu sinerjist etki Şekil 8'de gösterilmiştir.

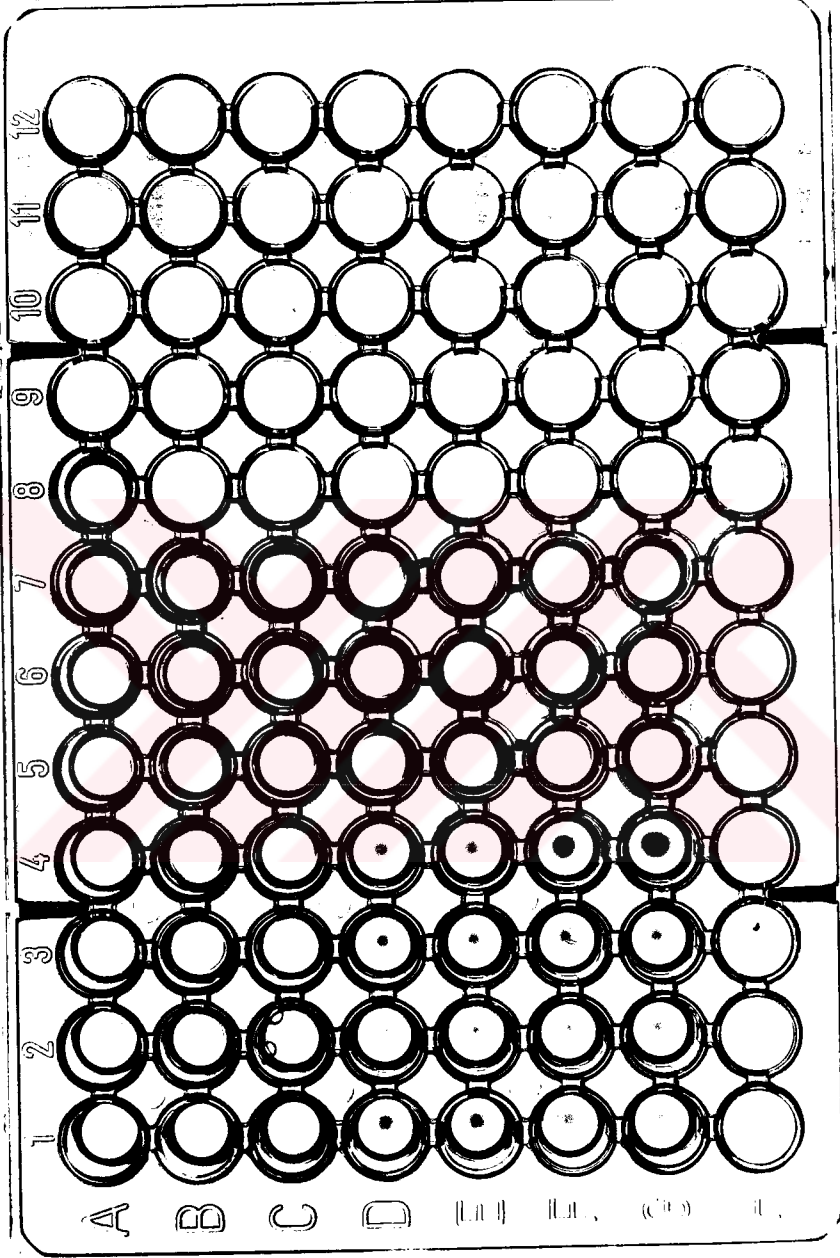
Bu çalışmada seftriakson-aminoglikozit kombinasyonlarının P.aeruginosa suşlarının çoğunda sinerjist etkili olduğu saptanmış, FİK 0.5 ve FİK <0.5 değerleri esas alındığında kombi-

nasyonlar arasında farklılık olduğu görülmüştür. Buna göre 50 P.aeruginosa suşundan 43'üne sinerjistik etki gösteren seftriakson-amikasin kombinasyonunun FİK değeri 0.5 olanların sayısı 28, FİK <0.5 olanların sayısı 15; suşların 45'ine sinerjistik etkili olan seftriakson-netilmisin kombinasyonunun FİK değeri 0.5 olanların sayısı 24, FİK <0.5 olanların sayısı 21; suşların 48'ine sinerjistik etki gösteren seftriakson-tobramisin kombinasyonunun FİK değeri 0.5 olanların sayısı 34, FİK <0.5 olanların sayısının 14 olduğu saptanmıştır. Bu değerlere ait bulgular Tablo 11'de verilmiştir.

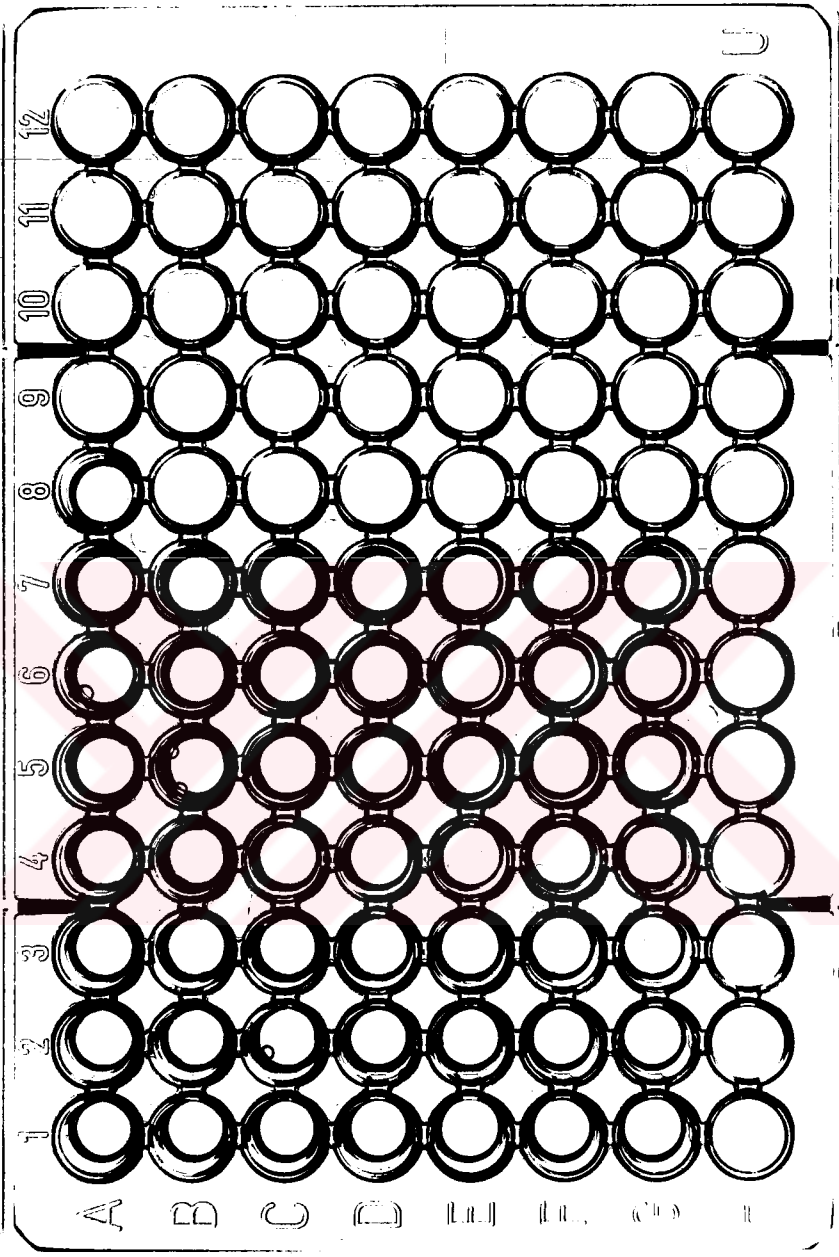
Tablo 11. P.aeruginosa suşlarına sinerjistik etkili olan seftriakson-aminoglikozit kombinasyonlarına ait FİK değerleri dağılımı

Antibiyotik kombinasyonu	Sinerjistik etki saptanan suş sayısı	Suş sayısı	
		FİK<0.5	FİK 0.5
Seftriakson-Amikasin	43	15	28
Seftriakson-Netilmisin	45	21	24
Seftriakson-Tobramisin	48	14	34





Şekil 7. Seftriakson-amikasin kombinasyonunun *P.aeruginosa* suşu üzerinde oluşturduğu additif etki



Şekil 8. Sertriakson-tobramisin kombinasyonunun P.aeruginosa suyu üzerinde oluşturduğu sinerjistik etki

## T A R T I Ş M A

Hastane infeksiyonlarında etken olarak *Pseudomonas aeruginosa*'nın bulunma sıklığı 1950 yılından itibaren artış göstermektedir. Bir hastane patojeni olarak *P.aeruginosa*'nın önem kazanmasının başlıca nedenleri, antibiyotik tedavisine direnç göstermesine bağlı olarak yüksek mortaliteye ve immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi infeksiyonlara neden olmasıdır. *P.aeruginosa*'nın hastane ortamındaki nemli yerlerde kolayca üreyebilme özelliği ve birçok dezenfektan maddeye direnç göstermesi nedeniyle üretral kateterizasyon, trakeostomi ve bel ponksiyonu gibi tıbbi aletlere dayalı işlem gören hastalarda infeksiyon riskini arttırmaktadır.

Hastanede *P.aeruginosa* infeksiyonlarının sıklığıyla ilgili ayrıntılı verileri bildiren kurumlardan biri, 1970 yılında A.B.D.'de Centers for Disease Control (CDC) tarafından kurulmuş olan National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) sistemidir. NNIS'nin (12), 1975, 1979 ve 1984 yıllarına ait verilerine göre *P.aeruginosa*'nın 1975 yılında tüm hastane infeksiyonlarının % 6.3'ünden, hastane kaynaklı idrar yolu infeksiyonlarının % 8.5'inden, alt solunum yolu infeksiyonlarının % 7.2'sinden, cerrahi yara infeksiyonlarının % 4.3'ünden; 1979 yılında tüm hastane infeksiyonlarının % 8.4'ünden, idrar yolu infeksiyonlarının % 11.4'ünden, alt solunum yolu infeksiyonlarının % 9.5'inden, cerrahi yara infeksiyonlarının % 5.9'undan; 1984 yılında tüm hastane infeksiyonlarının % 11.4'ünden, idrar yolu infeksiyonlarının % 12.7'sinden, alt solunum yolu infeksiyonlarının % 16.9'undan ve cerrahi yara infeksiyonlarının % 8.9'undan sorumlu olduğu saptanmıştır. Bu verilere göre tüm hastane infeksiyonlarının etkeni olarak 1975 yılında *Escherichia coli* başta olmak üzere *Staphylococcus aureus*, enterokok ve *klebsiella* cinsindeki türlerden sonra *P.aeruginosa*

beşinci sırayı alırken; 1984 yılında P.aeruginosa'nın E.coli'den sonra ikinci sıraya yükselmesi gün geçtikçe hastane infeksiyonlarında bulunma sıklığının sürekli artışını göstermektedir. Bu belirgin artış özellikle alt solunum yolları infeksiyonlarında gözlenmektedir; 1975 yılında etken olarak P.aeruginosa, klebsiella türleri, S.aureus ve E.coli'den sonra dördüncü sıradayken 1984 yılında başta yer almıştır.

Daschner'in (12), 1975 - 1980 yılları arasında 40.000 hastayı kapsayan bir araştırmasında P.aeruginosa'nın hastane kaynaklı idrar yolu infeksiyonlarının % 9.5'inden, yara infeksiyonlarının % 8.7'sinden, bakteriyemilerin % 5.6'sından, deri infeksiyonlarının % 7.2'sinden, pnömonilerin % 21.9'undan ve solunum yolu infeksiyonlarının % 18.8'inden sorumlu olduğu bildirilmiş ve ortaya çıkan sonuç CDC'nin verileriyle karşılaştırıldığında P.aeruginosa'nın en sık solunum yolu infeksiyonlarında, en az bakteriyemilerde saptandığı gözlenmiştir.

1985 yılında Berlin'deki üniversite hastanelerinin cerrahi ve iç hastalıkları yoğun bakım ünitelerinde yapılan bir araştırmada hastane infeksiyonu etkeni olarak P.aeruginosa iç hastalıkları yoğun bakım ünitelerinde izole edilen suşların sadece % 4.7'sini oluştururken, cerrahi yoğun bakım ünitelerinde suşların % 12.2'sini oluşturarak enterokoklar dahil olmak üzere streptokoklardan sonra ikinci sırayı aldığı saptanmış ve solunum yollarında en sık izole edilen hastane patojeni olarak (% 25) bildirilmiştir (12).

Çetin ve arkadaşları (19), İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda üriner sistem müdahalesi yapılan hastaların % 47.5'inde hastane kaynaklı idrar yolu infeksiyonu geliştiğini ve bu infeksiyonlara neden olan etkenlerin başında P.aeruginosa'nın geldiğini saptamışlardır.

Akalın ve arkadaşları (2), tarafından yürütülen ve Mayıs 1984 - Nisan 1985 döneminde Hacettepe Tıp Fakültesi'nde hastane infeksiyonları etkenlerinin araştırıldığı bir çalışmada

*P.aeruginosa*'nın başlıca etkenlerin arasında olduğu saptanmış, *E.coli* ve *Enterobacter* türlerinden sonra suşların % 19'unu oluşturduğu bildirilmiştir.

Yalçın ve arkadaşları (77), Temmuz - Aralık 1988 arasında aynı hastanedeki hastane infeksiyonlarının görülme sıklığını % 5.6 olarak saptamışlar ve bu infeksiyonların % 46.2'sinin Gram negatif çomaklar tarafından oluşturulduğunu bildirmişlerdir.

Akalın ve arkadaşları (3), aynı üniversite hastanesinde 1989 yılı içinde hastane infeksiyonlarının görülme sıklığını % 5.4 olarak saptamışlar ve bu infeksiyonların % 45.8'inin Gram negatif çomaklar tarafından oluşturulduğunu bildirmişlerdir.

Baysal ve arkadaşlarının (10) yaptıkları bir çalışmada, hastane infeksiyonu etkeni olan 204 Gram negatif çomak şeklindeki bakterilerden 58'ini *P.aeruginosa*'nın oluşturduğunu ve *E.coli*'den sonra hastane infeksiyonlarında izole edilen başlıca etken olduğunu bildirmişlerdir.

Hastane infeksiyonu etkeni olarak *P.aeruginosa*'nın gittikçe artan sıklıkta görülmesi ve antibiyotiklere direnç göstermesi sonucu bu mikroorganizma ile oluşan infeksiyonların tedavisinde güçlüklerin ortaya çıkması, onun sorun yaratan bir mikroorganizma olarak önem kazanmasına neden olmaktadır. *P.aeruginosa*'nın antibiyotiklere karşı oluşturduğu direnç çoğunlukla plazmitler aracılığıyla kazandığı inaktive edici enzimlerden ziyade dış membranından hücre içine hidrofilik bileşiklerin geçişini sağlayan kanalları oluşturan fonksiyonel F proteinlerinin sayıca az oluşundan kaynaklanmaktadır. Bir diğer faktör, bakteriyi dış etkilerden koruyup kolonizasyonunu kolaylaştıran, çevresini saran polisakkarit yapıdaki matrikstir. Çeşitli mekanizmalarla birçok antibiyotiğe gösterdiği dirençten dolayı, *P.aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler sınırlıdır.

Fass (26), mikrodilüsyon yöntemiyle 52 P.aeruginosa suşu üzerinde yapmış olduğu çalışmada seftriakson için saptanan MİK değerlerinin 8- >256 µl/ml arasında, MİK<sub>50</sub> değerinin 16 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değerinin 64 µg/ml olduğunu bildirmiştir. Watanakunakorn (75), seftriaksonun 50 P.aeruginosa suşuna karşı MİK değerlerini 4- >64 µg/ml arasında, MİK<sub>50</sub> değerini >64 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değerini >64 µg/ml olarak göstermiştir. Knapp ve arkadaşlarının bulgularına göre (48), seftriaksonun 212 P.aeruginosa suşuna karşı MİK değerleri ≤0.06- >16 µg/ml arasında, MİK<sub>50</sub> değeri 8 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> >16 µg/ml olarak belirtilmiştir.

Durupınar ve arkadaşlarının (23) çalışmasında, klinik örneklerden izole edilen P.aeruginosa suşlarının seftriaksona duyarlılığı % 19 oranında belirlenmiştir. Akalın ve arkadaşları (4), 1986 yılında hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen 102 P.aeruginosa suşunun % 67.7'sinin seftriaksona duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Köksal ve arkadaşlarının bulgularına göre (50), hastanede yatan hastalardan izole edilen P.aeruginosa suşlarının % 60.8'inin seftriaksona duyarlı olduğunu saptamışlardır. Baykal ve Akalın (9), çeşitli klinik örneklerden izole edilen 200 P.aeruginosa suşunun çeşitli antibiyotiklere duyarlılığını araştırmaları sonucunda seftriaksona direncin % 27 oranında görüldüğünü bildirmişlerdir.

Son yıllarda çeşitli bakteri suşlarının duyarlılık deneylerinde mikrodilüsyon yönteminden yararlanılmaktadır (4, 26, 30, 37, 43, 45, 47, 48, 50). Çalışmamızda mikrodilüsyon yöntemini deney koşullarımıza göre kontrol etmek amacıyla P.aeruginosa ATCC 27853 standart suşuna karşı seftriakson, amikasin, netilmisin ve tobramisin MİK değerleri araştırılmıştır. National Committee for Clinical Laboratory Standards'ın (NCCLS) belirlediği verilere göre seftriaksonun P.aeruginosa ATCC 27853 standart suşuna karşı MİK değerleri 8.0-32 µg/ml'dir (8). Çalışmamızda ise seftriaksonun P.aeru-

ginosa ATCC 27853 standart suşa karşı MİK değerinin 8 µg/ml olduğu saptanmış ve bu bulgunun NCCLS verileriyle uygunluk gösterdiği saptanmıştır.

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 *P.aeruginosa* suşuna karşı seftriaksonun mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerlerinin 8-256 µg/ml arasında, suşların % 50'sini inhibe eden antibiyotik konsantrasyonun 16 µg/ml ve % 90'ını inhibe eden konsantrasyonun 64 µg/ml olduğu belirlenmiştir. NCCLS verilerine göre seftriaksonun duyarlık sınırları;  $\leq 8$  µg/ml duyarlı, 16-32 µg/ml orta duyarlı ve  $\geq 64$  µg/ml dirençli kabul edilmiştir (8). Buna göre çalışmamızda kullandığımız suşların % 12'sinin duyarlı, % 56'sinin orta duyarlı ve % 32'sinin dirençli olduğu gözlenmiş ve elde edilen bu bulguların diğer araştırmacıların sonuçlarıyla uygunluk gösterdiği saptanmıştır.

Kluge ve arkadaşları (47), mikrodilüsyon yöntemiyle 130 *P.aeruginosa* suşu üzerinde yapmış oldukları çalışmada amikasinin suşların % 88'ini 10 µg/ml konsantrasyonda inhibe ettiğini ve amikesine dirençli suşlar için MİK değerinin en fazla 40 µg/ml olduğunu bildirmişlerdir. Briedis ve Robson (13), amikasinin 12.5 µg/ml konsantrasyonda *P.aeruginosa* suşlarının % 68.3'üne; Stewart ve arkadaşları (69), 0.20 µg/ml konsantrasyonda 50 *P.aeruginosa* suşunun % 12'sine, 3.12 µg/ml konsantrasyonda suşların % 90'ına etkili olduğunu bildirmişlerdir. Kantor ve Norden (44), amikasinin 1 µg/ml konsantrasyonda 23 *P.aeruginosa* suşunun % 66'sına, 4 µg/ml'de suşların % 96'sına ve 8 µg/ml'de suşların tümüne; Sanders ve arkadaşları (65), amikasinin 40 *P.aeruginosa* suşlarının tümüne 12.5 µg/ml konsantrasyonda etkili olduğunu bildirmişlerdir. Fu ve Neu (28), amikasinin hastanede uzun süre yatan hastalardan izole edilen 39 *P.aeruginosa* suşlarından % 90'ını 3.1 µg/ml konsantrasyonda inhibe ettiğini göstermişlerdir. Scribner ve arkadaşları (66), kistik fibrozlu hastalardan izole edilen 60 *P.aeruginosa* suşuna karşı amikasinin MİK

değerlerini 0.5-64 µg/ml arasında, MİK<sub>50</sub> değerini 8 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 16 µg/ml; Watanakunakorn (75), 43 P.aeruginosa suşuna karşı saptadığı MİK değerlerinin 1-32 µg/ml arasında, MİK<sub>50</sub> değerinin 2 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değerinin 8 µg/ml olduğunu bildirmişlerdir. Dhawan ve arkadaşlarının bulgularına göre (21), 632 P.aeruginosa suşunun % 74'ü 8 µg/ml ve % 91'i 16 µg/ml'de inhibe edilmiştir. Jones ve arkadaşları (42), yapmış oldukları çalışmada P.aeruginosa suşlarının % 85'inin ≤16 µg/ml konsantrasyonda amikasin tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

Durupınar ve arkadaşlarının (23) çalışmasında, klinik örneklerden izole edilen P.aeruginosa suşlarının amikesine duyarlılığı % 90 olarak belirlenmiştir. Akalın ve arkadaşları (4), 1986 yılında hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen 102 P.aeruginosa suşunun % 95.8'inin amikesine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Köksal ve arkadaşlarının bulgularına göre (50), hastanede yatan hastalardan izole edilen P.aeruginosa suşlarından % 90.6'sının amikesine duyarlı olduğunu saptamışlardır. Baykal ve Akalın (9), çeşitli klinik örneklerden izole edilen 200 P.aeruginosa suşunun çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı araştırmaları sonucunda amikesine direncin sadece % 7 oranında görüldüğünü saptamışlardır.

NCCLS'in belirlediği verilere göre amikasinin P.aeruginosa ATCC 27853 standart suşuna karşı MİK değerleri 2.0-8.0 µg/ml'dir (8). Çalışmamızda amikasinin bu standart suşa karşı MİK değerinin 4 µg/ml olduğu ve bu bulgunun NCCLS verileriyle uygunluk gösterdiği saptanmıştır.

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen 50 P.aeruginosa suşuna karşı amikasinin mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerlerinin 2-32 µg/ml arasında, suşların % 50'sini inhibe eden antibiyotik konsantrasyonunun 4 µg/ml, % 90'ını inhibe eden konsantrasyonun 16 µg/ml olduğu belirlenmiştir. NCCLS verilerine göre duyarlık sınırları; ≤16 µg/ml



duyarlı, 32µg/ml orta duyarlı ve  $\geq 64$  µg/ml dirençli kabul edilmiştir (8). Buna göre suşların % 98'inin amikasin'e duyarlı, % 2'sinin orta duyarlı ve suşlardan hiçbirinin direnç göstermediği gözlenmiştir. Elde edilen bu bulguların diğer araştırmacıların sonuçlarıyla uygunluk gösterdiği saptanmıştır.

Fu ve Neu'un (29), 1976 yılında 41 *P.aeruginosa* suşu üzerinde yapmış oldukları çalışmada netilmisinin suşların % 51'ini 0.8 µg/ml'de, % 78'ini 3.1 µg/ml konsantrasyonda inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Briedis ve Robson (13), agar dilüsyon yöntemiyle *P.aeruginosa* suşlarının sadece % 7.9'unun 3.1 µg/ml'de inhibe olduğunu göstermişlerdir. Stewart ve arkadaşları (69), netilmisinin 0.20 µg/ml konsantrasyonda 50 *P.aeruginosa* suşunun % 70'ine, 3.12 µg/ml'de % 90'ına; Sanders ve arkadaşları (65), 1.6 µg/ml konsantrasyonda 40 suşun tamamına etkili olduğunu bildirmişlerdir. Kantor ve Norden (44), netilmisinin 23 *P.aeruginosa* suşu için elde ettikleri MİK değerlerinin 0.5-64 µg/ml arasında olduğunu saptamışlardır. Fu ve Neu (28), netilmisinin hastanede uzun süre yatan hastalardan izole edilen 39 *P.aeruginosa* suşundan % 50'sini 3.1 µg/ml konsantrasyonda ve % 90'ını 50 µg/ml konsantrasyonda inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Dhawan ve arkadaşlarının bulgularına göre (21), 632 *P.aeruginosa* suşunun % 18'i 4 µg/ml, % 52'si 8 µg/ml konsantrasyonda netilmisin tarafından inhibe edilmiştir. Hallander ve arkadaşlarının (34), 1982 yılında 43 *P.aeruginosa* suşu ile yapmış oldukları çalışmada netilmisinin MİK değerlerini 0.25-512 µg/ml arasında, MİK<sub>50</sub> değerini 16 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değerini 64 µg/ml olarak saptamışlardır.

Durupınar ve arkadaşlarının (23) çalışmasında, klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının netilmisine duyarlılığı % 71 oranında belirlenmiştir. Akalın ve arkadaşları (4), 1986 yılında hastane infeksiyonu etkeni olarak izole

edilen 102 P.aeruginosa suşunun % 60.6'sının netilmisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Köksal ve arkadaşlarının bulgularına göre (50), hastanede yatan hastalardan izole edilen P.aeruginosa suşlarının % 70'inin netilmisine duyarlı olduğunu saptamışlardır. Baykal ve Akalın (9), çeşitli klinik örneklerden izole edilen 200 P.aeruginosa suşunun çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı araştırmaları sonucunda netilmisine direncin % 29 oranında görüldüğünü bildirmişlerdir.

NCCLS'in belirlediği verilere göre netilmisinin P.aeruginosa ATCC 27853 standart suşuna karşı MİK değerleri 2.0-8.0 µg/ml'dir (8). Çalışmamızda netilmisinin bu standart suşa karşı MİK değerinin 4 µg/ml olduğu ve bu bulgunun NCCLS verileriyle uygunluk gösterdiği saptanmıştır.

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 P.aeruginosa suşuna karşı netilmisinin mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerlerinin 4-64 µg/ml arasında, suşların % 50'sini inhibe eden antibiyotik konsantrasyonunun 8 µg/ml ve % 90'ını inhibe eden konsantrasyonun 32 µg/ml olduğu belirlenmiştir. NCCLS ve diğer standart laboratuvarların verilerine göre netilmisin için duyarlık sınırları; ≤8 µg/ml duyarlı, 16 µg/ml orta duyarlı ve ≥32 µg/ml dirençli kabul edilmiştir (8, 70). Buna göre çalışmamızda, suşların % 54'ünün duyarlı, % 26'sinin orta duyarlı, % 20'sinin dirençli olduğu gözlenmiş ve elde edilen bu bulguların diğer araştırmacıların sonuçları ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Kluge ve arkadaşları (47), 1974 yılında mikrodilüsyon yöntemiyle 130 P.aeruginosa suşu üzerinde yapmış oldukları çalışmada tobramisin suşların % 89'unu 5 µg/ml konsantrasyonda inhibe ettiğini ve suşların % 11'inin dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Briedis ve Robson (13), tobramisin 3.1 µg/ml konsantrasyonda P.aeruginosa suşlarının % 87.3'üne; Stewart ve arkadaşları (69), 0.20 µg/ml'de 50 P.aerugi-

nosa suşunun % 88'ine; Sanders ve arkadaşları (65), 6.2 µg/ml'de denemiş oldukları tüm P.aeruginosa suşlarına etkili olduğunu bildirmişlerdir. Fu ve Neu (28), hastanede uzun süre yatan hastalardan izole edilen 39 P.aeruginosa suşuna karşı tobramisin'in MİK<sub>50</sub> değerini 0.8 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değerini 12.5 µg/ml olarak saptamışlardır. Dhawan ve arkadaşlarının bulgularına göre (21), tobramisin 632 P.aeruginosa suşunun % 96'sını 4 µg/ml ve % 98'ini 8 µg/ml konsantrasyonda inhibe etmiştir. Scribner ve arkadaşları (66), kistik fibrozlu hastalardan izole edilen 60 P.aeruginosa suşuna karşı tobramisin'in MİK değerlerini 0.5-16 µg/ml arasında, MİK<sub>50</sub> değerini 2 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 4 µg/ml; Watanakunakorn (75), 43 P.aeruginosa suşuna karşı saptadığı MİK değerlerinin 0.125-→64 µg/ml arasında, MİK<sub>50</sub> değerinin 1 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değerinin 2 µg/ml olduğunu bildirmişlerdir. Fass (26), 52 P.aeruginosa suşuna karşı tobramisin'in MİK değerlerini <0.25-→16 µg/ml arasında, MİK<sub>50</sub> değerini 1 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değerini 4 µg/ml olarak saptamış ve tobramisine duyarlı suşların % 94 oranında olduğunu bildirmiştir.

Durupınar ve arkadaşlarının (23) çalışmasında, klinik örneklerden izole edilen P.aeruginosa suşlarının tobramisine duyarlılığı % 21 oranında belirlenmiştir. Akalın ve arkadaşları (4), 1986 yılında hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen 102 P.aeruginosa suşunun % 50.7'sinin tobramisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Köksal ve arkadaşlarının bulgularına göre (50), hastanede yatan hastalardan izole edilen P.aeruginosa suşlarının % 43.4'ünün tobramisine duyarlı olduğunu saptamışlardır. Baykal ve Akalın (9), çeşitli klinik örneklerden izole edilen 200 P.aeruginosa suşunun çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı araştırmaları sonucunda tobramisine direncin % 27 oranında görüldüğünü bildirmişlerdir.

NCCLS'in belirlediği verilere göre tobramisin'in P.aeruginosa ATCC 27853 standart suşuna karşı MİK değerleri

0.5-2.0 µg/ml'dir (8). Çalışmamızda tobramisin bu standart suşa karşı MİK değerinin 0.5 µg/ml olduğu ve bu bulgunun NCCLS verileriyle uygunluk gösterdiği saptanmıştır.

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 P.aeruginosa suşuna karşı tobramisin mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerlerinin 0.5-64 µg/ml arasında, suşların % 50'sini inhibe eden antibiyotik konsantrasyonunun 1 µg/ml ve % 90'ını inhibe eden konsantrasyonun 4 µg/ml olduğu belirlenmiştir. NCCLS verilerine göre tobramisin için duyarlık sınırları;  $\leq 4$  µg/ml duyarlı, 8 µg/ml orta duyarlı ve  $\geq 16$  µg/ml dirençli kabul edilmiştir (8). Buna göre çalışmamızda kullandığımız suşların % 86'sinin tobramisine duyarlı ve % 14'ünün dirençli olduğu gözlenmiş ve elde edilen bulguların diğer araştırmacıların sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Çalışmamızda denenen antibiyotiklerin P.aeruginosa suşlarına karşı tek başına etkileri karşılaştırıldığında seftriaksonun en az etkili antibiyotik olduğu gözlenmiştir. Denenen aminoglikozit grubu antibiyotiklerden en etkilisinin suşların % 90'ını 4 µg/ml konsantrasyonda inhibe eden tobramisin olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda suşların % 14'ünün tobramisine direnç göstermesi tedavideki önemli yerine rağmen bu antibiyotiğe karşı dirençli suşların gelişmekte olduğunu göstermektedir. Amikasin tartım bazında tobramisin kadar etkili olmamasına rağmen, çalışmamızda incelediğimiz suşlardan hiçbirinin bu antibiyotiğe karşı direnç göstermemesi, tobramisine dirençli suşların etken olduğu P.aeruginosa infeksiyonlarının tedavisinde amikasinin seçilmesi gerektiğini göstermektedir. Amikasinin P.aeruginosa suşlarına karşı diğer aminoglikozit antibiyotiklere göre bu üstünlüğü, plazmit tarafından kodlanan 6'-N-asetiltransferaz (AAC 6') enzimiyle sadece inaktive olmasından kaynaklanmaktadır. Bulgularımıza göre netilmisinin P.aeruginosa suşları üzerine amikasin ve

tobramisin kadar etkili olmamasına rağmen bu bakterinin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde seçilebilir bir antibiyotik olduğunu göstermektedir.

Antibiyotiklerin kombinasyon halinde kullanımı genellikle infeksiyon etkeni bilinmediğinde veya infeksiyona neden olan suşların sayısı birden fazla ise antibiyotiklerin etki spektrumunu genişletmek, bakterisid etkilerini arttırmak veya hızlandırmak ve suşların antibiyotiklere karşı direnç kazanmalarını önlemek amacıyla uygulanmaktadır. Bir diğer faktör, antibiyotikler arasındaki sinerjistik etkiden yararlanarak daha düşük dozda uygulanmaları sonucu toksisite olasılığını azaltmaktır (6, 39).

Antibiyotiklerin kombinasyon halinde kullanılması daha çok endokardit ve septisemi vakalarında veya nötropeni gibi faktörlerle immün sistemi baskılanmış kişilerde oluşan infeksiyonların tedavisinde avantaj sağlamaktadır. Özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde oluşan P.aeruginosa infeksiyonları nedeniyle ölüm oranı yüksek olmakta ve pseudomonaslara etkili beta laktam grubu antibiyotikler tedavide yetersiz kalmaktadır. P.aeruginosa'nın etken olduğu infeksiyonların tedavisinde beta laktam grubu antibiyotikler aminoglikozitlerle birlikte kullanıldığında başarılı sonuç vermektedir. Bu kombinasyonun sinerjistik etkisi, hücre duvarına etkili beta laktam grubu antibiyotiklerin aminoglikozitlerin intraselüler konsantrasyonunu arttırması sonucu oluşmaktadır (6).

Klastersky ve arkadaşları (46), kanser hastalarında oluşan P.aeruginosa infeksiyonlarının tedavisinde, % 80 oranında sinerjistik etki gösteren tikarsilin-tobramisin kombinasyonunun seçilebilir bir antibiyotik kombinasyonu olduğunu saptamışlardır. Comber ve arkadaşları (16), P.aeruginosa'nın etken olduğu ciddi infeksiyonlarda tikarsilin-tobramisin kombinasyonunun; Heineman ve Lofton (38), P.aeruginosa infeksiyonlarında tikarsilin ve aminoglikozit kombinasyonları-

nın tek başına kullanımından daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Karbenisilin aminoglikozitlerle oluşturulan kombinasyonların *P.aeruginosa* suşlarına karşı sinerjistik etkili olduğu Kluge ve arkadaşları (47), Kelly ve Matsen (45) tarafından bildirilmiştir. Neu ve Fu (58), azlosilin ve mezlosilinin gentamisin, özellikle amikasin veya netilmisin ile kombine edildiğinde en fazla *P.aeruginosa* suşlarına karşı sinerjistik etkinin görüldüğünü ve bu etkinin karbenisilin-aminoglikozit kombinasyonlarına göre daha sık olduğunu bildirmişlerdir. Kurtz ve arkadaşları (52), amikasinin moksalaktam veya piperasilin ile kombine edildiğinde *P.aeruginosa* ve *Serratia marcescens* suşlarına karşı önemli derecede sinerjistik etkinin görüldüğünü saptamışlardır. Kistik fibrozlu hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarına karşı çeşitli beta laktam ve aminoglikozit kombinasyonlarının etkileri araştırıldığı çalışmalarda Scribner ve arkadaşları (66), en fazla sinerjistik etkinin amikasin-azlosilin kombinasyonu (% 65); Bosso ve arkadaşları (11), sinerjizmin en fazla aztreonam-tobramisin kombinasyonu (% 56.4) görüldüğünü ve tedavide direnç oluşumunu önlemek amacıyla sinerjistik etkili kombinasyonların antibiyotiklerin tek başına kullanımlarından daha etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Jones ve Packer (41), amikasin kombinasyonlarının üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı orta duyarlı olan *Enterobacteriaceae*'de bulunan suşlara % 54.1-69.6 oranında sinerjistik etkili olduklarını; Hallander ve arkadaşları (34), *P.aeruginosa* suşlarına karşı sefalosporin-aminoglikozit kombinasyonlarının olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Johnson ve arkadaşları (40), nötropenili farelerde oluşturdukları deneysel *P.aeruginosa* bakteriyemi ve peritonitine karşı beta laktam-aminoglikozit kombinasyonu ile yapılan tedavinin, iki beta laktam grubu antibiyotik kombinasyonundan ve bu antibiyotiklerin tedavide tek başına kullanılmasından daha etkili olduğunu saptamışlardır. Neu ve arkadaşları (59), seftriakson-gentamisin kombinasyonunun de-

neden 5 P.aeruginosa suşlarından birine karşı sinerjist etkili olduğunu bildirmişlerdir. Fass (26), çalışmasında seftriakson-tobramisin kombinasyonunun 52 P.aeruginosa suşunun % 73'üne karşı sinerjist etkili olduğunu bildirmiştir. Giamarellou ve arkadaşları (31), çoğul direnç gösteren 30 P.aeruginosa suşu üzerinde yapmış oldukları çalışmada amikasinle oluşturulan kombinasyonların diğer aminoglikozitlere göre daha fazla sinerjist etki gösterdiklerini ve aminoglikozitlerle en fazla sinerjist etkinin elde edildiği kombinasyonların sırasıyla seftazidim ve seftriakson, moksalaktam, aztreonam, sefotaksim, azlosilin, sefoperazon, sefsulodin, karbenisilin ile olanların olduğunu bildirmişlerdir. Scribner ve arkadaşları (66) ve Watanakunakorn (75) çalışmalarında beta laktam ve aminoglikozit kombinasyonlarının düşük oranda antagonist etki oluşturduklarını göstermişlerdir. Beta laktam-aminoglikozit grubu antibiyotiklerin kombinasyonu ile ilgili yapılmış çalışmaların büyük bir kısmında P.aeruginosa suşlarına karşı antagonist etkilerine ait bulgulara rastlanmamıştır (11, 16, 38, 41, 45, 52, 58).

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 P.aeruginosa suşuna karşı seftriaksonun amikasin, netilmisin ve tobramisin ile kombinasyonlarının etkisi mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemiyle araştırılmış ve sonuçlar FİK indeksine göre değerlendirilmiştir. Buna göre seftriakson-amikasin kombinasyonunun suşların % 86'sına sinerjist, % 14'üne additif etkili; seftriakson-netilmisin kombinasyonunun suşların % 90'ına sinerjist, % 10'una additif etkili; seftriakson-tobramisin kombinasyonunun suşların % 96'sına sinerjist, % 4'üne additif etkili olduğu ve bu antibiyotik kombinasyonlarından hiçbirinin suşlara karşı antagonist etki göstermediği gözlenmiştir. Elde edilen bu bulguların diğer araştırmacıların sonuçları ile uygunluk gösterdiği saptanmıştır.

Çalışmamızda denenen antibiyotik kombinasyonlarının P.aeruginosa suşlarına etkileri karşılaştırıldığında en sık sinerjistik etki gösteren kombinasyonun seftriakson-tobramisin olduğu gözlenmiştir. Bu kombinasyonun additif etki gösterdiği iki suşa karşı diğer kombinasyonlar da aynı etkiyi göstermiştir. P.aeruginosa suşlarına karşı sinerjizm gösteren seftriakson-aminoglikozit kombinasyonlarının  $<0.5$  FİK indekslerinde farklılık gözlenmiştir. Buna göre seftriakson-amikasin kombinasyonunun sinerjistik etki gösterdiği 43 suştan 15'ine, seftriakson-netilmisin kombinasyonunun sinerjistik etki gösterdiği 45 suştan 21'ine ve seftriakson-tobramisin kombinasyonunun sinerjistik etki gösterdiği 48 suştan 14'üne karşı saptanan FİK indeksi  $<0.5$  olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgulara göre seftriakson-netilmisin kombinasyonunun diğer kombinasyonlardan kısmen daha fazla inhibitör etkisi olduğu saptanmıştır. Seftriakson-amikasin kombinasyonu diğer kombinasyonlara göre biraz daha az sayıdaki P.aeruginosa suşlarına sinerjistik etki göstermesine rağmen, suşlardan hiçbirinin amikasin direnç göstermediği göz önüne alındığında, bu kombinasyonun dirençli suşlara karşı seçilebilir bir kombinasyon olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak bulgularımız ciddi P.aeruginosa infeksiyonlarının tedavisinde direnç gelişimini önlemek ve olası mikst infeksiyon varlığında geniş etki spektrumunu elde etmek amacıyla seftriaksonun amikasin, netilmisin ve tobramisin ile olan kombinasyonlarının önemli bir yer tutacağını göstermektedir. Ayrıca penisiline karşı allerjisi olan kişilerde penisilin-aminoglikozit kombinasyonları yerine seçilebilir bir kombinasyon olduğunu ortaya koymaktadır.



## S O N U Ç

Seftriaksonun amikasin, netilmisin ve tobramisin ile olan kombinasyonlarının çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 *Pseudomonas aeruginosa* suşuna karşı *in vitro* etkilerinin araştırıldığı çalışmada, öncelikle bu antibiyotiklerin suşlara karşı tek başına etkileri mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. Buna göre suşların seftriaksona % 12, amikasine % 98, netilmisine % 54, tobramisine % 86 oranında duyarlı ve seftriaksona % 56, amikasine % 2, netilmisine % 26 oranında orta duyarlı olduğu saptanmıştır. Bulgularımız amikasinin *P.aeruginosa* suşlarına karşı en etkili antibiyotik olduğunu ve suşlardan hiçbirinin bu antibiyotiğe karşı direnç göstermemesi, bu mikroorganizmaya etkili olan tobramisine dirençli suşların etken olduğu *P.aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde seçilmesi gereken bir antibiyotik olduğunu göstermektedir.

Seftriaksonun amikasin, netilmisin ve tobramisin ile kombinasyonlarının aynı suşlara karşı *in vitro* etkileri mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemiyle araştırılmış ve sonuçlar FİK indeksine göre değerlendirilmiştir. Buna göre 50 *P.aeruginosa* suşuna karşı seftriakson-amikasin kombinasyonu % 86, seftriakson-netilmisin kombinasyonu % 90 ve seftriakson-tobramisin kombinasyonu % 96 oranında sinerjist etki gösterdiği saptanmış ve bu kombinasyonlardan hiçbirinin suşlara karşı antagonist etki göstermediği gözlenmiştir. Çalışmamızda *P.aeruginosa* suşlarına karşı sinerjist etkinin en sık gözleendiği kombinasyonun seftriakson-tobramisin olduğu saptanmış, ancak amikasine karşı suşlardan hiçbirinin direnç göstermediği göz önüne alınırsa seftriakson-amikasin kombinasyonunun dirençli suşların etken olduğu infeksiyonlarda seçilebilir bir kombinasyon olduğu düşüncesine varılmıştır.

Bulgularımız ciddi P.aeruginosa infeksiyonlarının tedavisinde direnç gelişimini önlemek ve olası mikst infeksiyon varlığında geniş etki spektrumu elde etmek amacıyla seftriaksonun amikasin, netilmisin ve tobramisin ile olan kombinasyonlarının önemli bir yer teşkil edebileceğini göstermektedir.



## Ö Z E T

Pseudomonas aeruginosa'nın hastane infeksiyonu etkeni olarak gün geçtikçe artan sıklıkla izole edilmesi ve özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde oluşturduğu infeksiyonların tedavisinde güçlük yaratması, tedavide antibiyotik kombinasyonlarının önemini arttırmıştır. Bu amaçla çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 P.aeruginosa suşuna karşı seftriakson, amikasin, netilmisin ve tobramisin tek başına in vitro etkileri mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılıp MİK değerleri saptanmış ve seftriaksonun bu aminoglikozitlerle kombinasyonlarının in vitro etkisi mikrodilüsyon "checkerboard" yöntemiyle araştırılıp FİK indeksleri saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, seftriaksonun P.aeruginosa suşlarına karşı tek başına önemli bir etkisinin olmadığını, suşlardan hiçbirinin direnç oluşturmadığı amikasinin, tobramisin ve netilmisinden üstün olduğunu göstermektedir. Seftriaksonun amikasin, netilmisin ve tobramisin ile kombinasyonlarının P.aeruginosa suşlarına karşı % 86-96 arasında sinerjistik etki göstermesi ve antagonist etkinin görülmemesi bu kombinasyonların P.aeruginosa infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir yer tutacağını göstermektedir.

## Z U S A M M E N F A S S U N G

Die häufige Isolierung von *Pseudomonas aeruginosa* als Erreger von Krankenhausinfektionen und insbesondere die schwierigen Therapiemöglichkeiten bei Patienten mit geschwächten Immunsystem erhöhen bei der Therapie die Bedeutung der Antibiotica in Kombinationen. Aus diesem Grunde wurden die In vitro Wirkungen von Ceftriaxone, Amikacin, Netilmicin und Tobramycin einzeln gegen verschiedene klinisch isolierte 50 *P.aeruginosa* Stämme mit der Mikrodilutionsmethode untersucht und die MIK-Werte festgestellt. Anschließend wurden die kombinierten In vitro Wirkungen von Ceftriaxone und den Aminoglykosiden mit der Mikrodilution-Checkerboard-Methode untersucht und die FIK-Indexe festgestellt. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, daß Ceftriaxone alleine keine bedeutsame Wirkung gegen die *P.aeruginosa* Stämme hatte, daß Amikacin, gegen den die *P.aeruginosa* Stämme nichtresistent waren, wirksamer war als Tobramycin und Netilmicin. Die Kombinationen von Ceftriaxone mit Amikacin, Netilmicin und Tobramycin hatten gegen die *P.aeruginosa* Stämme eine synergische Wirkung von 86-96 % und keine antagonistische Wirkung. Diese Ergebnisse zeigen, daß die oben genannten Kombinationen bei der Behandlung von *P.aeruginosa* Infektionen von Bedeutung sein werden.

## K A Y N A K L A R

1. Ahmad M H, Reichenmacher A, Böck A: Interaction between Aminoglycoside Uptake and Ribosomal Resistance Mutations, Antimicrob Agents Chemother 18: 798 (1980).
2. Akalın H E, Baykal M, Akın S: Hastane infeksiyonlarına neden olan bakterilerin dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları, KÜKEM Derg 8: 174 (1985).
3. Akalın H E, Işık F, Baykal M, Sayek İ: Hacettepe Üniversitesi Hastanelerinde hastane infeksiyonları:1989, ANKEM Derg 4: 276 (1990).
4. Akalın H E, Köksal İ, Kardeş T, Baykal M: Çeşitli antibiyotiklerin Gram negatif bakterilere in-vitro aktiviteleri, ANKEM Derg 1: 79 (1987).
5. Akalın H E, Özışık Y, Oktay A, Oto A, Baykal M: Amikasinin çoğul dirençli bakterilerle gelişen infeksiyonlarında klinik etkinliği, ANKEM Derg 2: 236 (1988).
6. Allan J D, Moellering R C: Management of Infections Caused by Gram-Negative Bacilli: The Role of Antimicrobial Combinations, Rev Infect Dis (Suppl 4) 7: 559 (1985).
7. Anhalt J P, Washington J A: Preparation and Storage of Antimicrobial Solutions "E H Lennette, A Ballows, W J Hausler, H J Shadomy (eds): Manual of Clinical Microbiology 4. baskı" kitabında s 1019, American Society for Microbiology Washington D C (1985).
8. ASM7-A: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Vol 5, Nr 22, NCCLS, Villanova (1985).
9. Baykal M, Akalın H E: Pseudomonas aeruginosa'nın çeşitli antibiyotiklere dirençliği, KÜKEM Derg 9: 136 (1986).

10. Baysal B, Özenci H, Şengil A Z, Tuncer İ, Özdengil F: Hastane infeksiyonlarından izole edilen Gram negatif çomakların aminoglikozit ve sefalosporinlere duyarlılığının karşılaştırılması, ANKEM Derg 3: 176 (1989).
11. Bosso J A, Saxon B A, Matsen J M: In Vitro Activity of Aztreonam Combined with Tobramycin and Gentamicin against Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* from Patient with Cystic Fibrosis, Antimicrob Agents Chemother 31: 1403 (1987).
12. Botzenhart K, Rüden H: Hospital Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiot Chemother 39: 1 (Karger, Basel 1987).
13. Briedis D J, Robson H G: Comparative Activity of Netilmicin, Gentamicin, Amikacin and Tobramycin Against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae, Antimicrob Agents Chemother 10: 592 (1976).
14. Bryan L E: Antibiotic Uptake and the Cytoplasmic Membrane, Antibiot Chemother 36: 103 (Karger, Basel 1985).
15. Bryan L E, Kwan S: Roles of Ribosomal Binding, Membran Potential and Electron Transport in Bacterial Uptake of Streptomycin and Gentamicin, Antimicrob Agents Chemother 23: 835 (1983).
16. Comber K R, Basker M J, Osborne C D, Sutherland R: Synergy Between Ticarcillin and Tobramycin Against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae In Vitro and In Vivo, Antimicrob Agents Chemother 11: 956 (1977).
17. Costerton J W: *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease "L D Sabath (ed): *Pseudomonas aeruginosa* the organism, diseases it causes, and their treatment" kitabında s 15, Hans Huber Publishers, Bern (1980).
18. Cross A S: Evolving Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* Infections, Eur J Clin Microbiol 4: 156 (1985).

19. Çetin E T, Derbentli Ş, Töreci K, Tellaloğlu S, Akıncı M, Selhanoğlu M: Nozokomiyal idrar yolu infeksiyonlarının incelenmesi, ANKEM Derg 1: 242 (1987).
20. Davies J E: Resistance to Aminoglycosides: Mechanisms and Frequency, Rev Infect Dis (Suppl 2) 5: 261 (1983).
21. Dhawan V, Marso E, Martin W J, Young L S: In Vitro Studies with Netilmicin Compared with Amikacin, Gentamicin, and Tobramycin, Antimicrob Agents Chemother 11: 64 (1977).
22. Döring G, Maier M, Müller E, Bibi Z, Tümmler B, Kharazmi A: Virulence Factors of Pseudomonas aeruginosa, Antibiot Chemother 39: 136 (Karger, Basel 1987).
23. Durupınar B, Özkuyumcu C, Dikmen N: Klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı, ANKEM Derg 3: 181 (1989).
24. Eickhoff T C, Ehret J M: In Vitro Activity of Netilmicin Compared with Gentamicin, Tobramycin, Amikacin and Kanamycin, Antimicrob Agents Chemother 11: 791 (1977).
25. Elion G B, Singer S, Hitchings G H: Antagonists of Nucleic Acid Derivatives VIII. Synergism In Combinations of Biochemically Related Antimetabolites, J Biol Chem 208: 477 (1953).
26. Fass R J: Comparative In Vitro Activities of B-Lactam - Tobramycin Combinations Against Pseudomonas aeruginosa and Multidrug-Resistant Gram-Negative Enteric Bacilli, Antimicrob Agents Chemother 21: 1003 (1982).
27. Ferron A: Bacteriologie Medicale, 10.ed, s 31-1, Editions Crouan & Roques, Lille (1980).
28. Fu K P, Neu H C: Activity of 5-Episisomicin Compared with That of Other Aminoglycosides, Antimicrob Agents Chemother 14: 194 (1978).
29. Fu K P, Neu H C: In Vitro Study of Netilmicin Compared with Other Aminoglycosides, Antimicrob Agents Chemother 10: 526 (1976).

30. Gavan T L, Town M A: A Microdilution Method for Antibiotic Susceptibility Testing, Am J Clin Pathol 53: 880 (1970).
31. Giamarellou H, Zissis N P, Tagari G, Bouzos J: In Vitro Synergistic Activities of Aminoglycosides and New  $\beta$ -Lactams Against Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrob Agents Chemother 25: 534 (1984).
32. Gilardi G L: *Pseudomonas* "E H Lennette, A Ballows, W J Hausler, H J Shadomy (eds): Manual of Clinical Microbiology, 4. baskı" kitabında s 350, American Society for Microbiology, Washington D C (1985).
33. Gilbert D N: An Evaluation of Antipseudomonal Antimicrobial Agents, Antibiot Chemother 36: 111 (Karger, Basel 1985).
34. Hallander H O, Dornbusch K, Gezelius L, Jacobson K, Karlsson I: Synergism Between Aminoglycosides and Cephalosporins with Antipseudomonal Activity: Interaction Index and Killing Curve Method, Antimicrob Agents Chemother 22: 743 (1982).
35. Hancock R E W: The *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Permeability Barrier and How to Overcome It, Antibiot Chemother 36: 95 (Karger, Basel 1985).
36. Hancock R E W, Wong P G W: Compounds Which Increase the Permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Antimicrob Agents Chemother 26: 48 (1984).
37. Harwick H J, Weiss P, Fekety F R: Application of microtitration techniques to bacteriostatic and bactericidal antibiotic susceptibility testing, J Lab Clin Med 72: 511 (1968).
38. Heineman H S, Lofton W M: Unpredictable Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Synergistic Antibiotic Combinations In Vitro, Antimicrob Agents Chemother 13: 827 (1978).
39. Jackson G G: Combination antibiotic therapy: General principles, ANKEM Derg 1: 282 (1987).



40. Johnson D E, Thompson B, Calia F M: Comparative Activities of Piperacillin, Ceftazidime, and Amikacin, Alone and in All Possible Combinations, against Experimental *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Neutropenic Rats, *Antimicrob Agents Chemother* 27: 735 (1985).
41. Jones R N, Packer R R: Antimicrobial Activity of Amikacin Combinations Against Enterobacteriaceae Moderately Susceptible to Third-Generation Cephalosporins, *Antimicrob Agents Chemother* 22: 985 (1982).
42. Jones R N, Thornsberry C, Barry A L, Packer R R, Baker C N, Badal R E: Compound A49756, the 3-O-Demethyl Derivative of Fortimicin A: In Vitro Comparison with Six Other Aminoglycoside Antibiotics, *Antimicrob Agents Chemother* 18: 773 (1980).
43. Jorgensen J H, Lee J C, Jones P M: Chemically Defined Antimicrobial Susceptibility Test Medium for *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 11: 415 (1977).
44. Kantor R J, Norden C W: In Vitro Activity of Netilmicin, Gentamicin and Amikacin, *Antimicrob Agents Chemother* 11: 126 (1977).
45. Kelly M T, Matsen J M: In Vitro Activity, Synergism and Testing Parameters of Amikacin, with Comparison to Other Aminoglycoside Antibiotics, *Antimicrob Agents Chemother* 9: 440 (1976).
46. Klastersky J, Hengsgens C, Debusscher L: Empiric Therapy for Cancer Patients: Comparative Study of Ticarcillin-Tobramycin, Ticarcillin-Cephalothin and Cephalothin-Tobramycin, *Antimicrob Agents Chemother* 7: 640 (1975).
47. Kluge R M, Standiford H C, Tatem B, Young V M, Greene W H, Schimpff S C, Calia F M, Hornick R B: Comparative Activity of Tobramycin, Amikacin and Gentamicin Alone and with Carbenicillin Against *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 6: 442 (1974).

48. Knapp C C, Sierra-Madero J, Washington J A: Antibacterial Activities of Cefpodoxime, Cefixime, Ceftriaxone, Antimicrob Agents Chemother 32: 1896 (1988).
49. Krogstad D J, Moellering R C: Antimicrobial Combinations "V Lorian (ed): Antibiotics in Laboratory Medicine, 2. bas-kı" kitabında s 537, William & Wilkins, Baltimore, USA (1986).
50. Köksal İ, Koç F, Cirav Z, Algan T: Pseudomonas aeruginosa suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılık durumlarının araştırılması, ANKEM Derg 4: 206 (1990).
51. Kucers A, Bennett N K: The Use of Antibiotics, third edition, William Heinemann Medical Books Ltd, London (1979).
52. Kurtz T O, Winston D J, Bruckner D A, Martin W J: Comparative In Vitro Synergistic Activity of New Beta-Lactam Antimicrobial Agents and Amikacin Against Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens, Antimicrob Agents Chemother 20: 239 (1981).
53. Meyer R D, Kraus L L, Pasiiecznik K A: In Vitro Susceptibility of Gentamicin-Resistant Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa to Netilmicin and Selected Aminoglycoside Antibiotics, Antimicrob Agents Chemother 10: 677 (1976).
54. Moellering R C: In Vitro Antibacterial Activity of the Aminoglycoside Antibiotics, Rev Infect Dis (Suppl 2) 5: 212 (1983).
55. Moore R A, Woodruff W A, Hancock R E W: Antibiotic Uptake Pathways across the Outer Membrane of Pseudomonas aeruginosa, Antibiot Chemother 39: 172 (Karger, Basel 1987).
56. Murray P R: Activity of Cefotaxime-Aminoglycoside Combinations Against Aminoglycoside-Resistant Pseudomonas, Antimicrob Agents Chemother 17: 474 (1980).
57. Neu H C: Structure-Activity Relations of New  $\beta$ -Lactam Compounds and in Vitro Activity against Common Bacteria, Rev Infect Dis (Suppl 2) 5: 319 (1983).

58. Neu H C, Fu K P: Synergy of Azlocillin and Mezlocillin Combined With Aminoglycoside Antibiotics and Cephalosporins, *Antimicrob Agents Chemother* 13: 813 (1978).
59. Neu H C, Meropol N J, Fu K P: Antibacterial Activity of Ceftriaxone (Ro 13-9904), a  $\beta$ -Lactamase-Stable Cephalosporin, *Antimicrob Agents Chemother* 19: 414 (1981).
60. Paradelis A G, Douboyas J, Stathopoulos G, Edipides A G, Triantaphylidis C, Papapanagiotou J: In Vitro Comparison of Kanamycin, Kanendomycin, Gentamicin, Amikacin, Sisomicin and Dibecain Against 200 Strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 14: 514 (1978).
61. Peterson P K: Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* "L D Sabath (ed): *Pseudomonas aeruginosa* the organism, diseases it causes, and their treatment" kitabinda s 103, Hans Huber Publishers, Bern (1980).
62. Ramphal R, Pyle M: Further Characterization of the Tracheal Receptor for *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur J Clin Microbiol* 4: 160 (1985).
63. Rhame F S: The ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* "L D Sabath (ed): *Pseudomonas aeruginosa* the organism, diseases it causes, and their treatment" kitabinda s 31, Hans Huber Publishers, Bern (1980).
64. Richmond M H: Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics "L D Sabath (ed): *Pseudomonas aeruginosa* the organism, diseases it causes, and their treatment" kitabinda s 176, Hans Huber Publishers, Bern (1980).
65. Sanders C C, Sanders W E, Goering R V: In Vitro Studies with Sch 21420 and Sch 22591: Activity in Comparison with Six Other Aminoglycosides and Synergy with Penicillin Against Enterococci, *Antimicrob Agents Chemother* 14: 178 (1978).
66. Scribner R K, Marks M I, Weber A H, Tarpay M M, Welch D F: Activities of Various  $\beta$ -Lactams and Aminoglycosides, Alone and in Combinations, Against Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis, *Antimicrob Agents Chemother* 21: 939 (1982).

67. Shannon K, Phillips I: Mechanisms of resistance to aminoglycosides in clinical isolates, J Antimicrob Chemother 9: 91 (1982).
68. Snyderman D R, Tally F P, Landesman S H, Barza M, Gorbach S L: Netilmicin in Gram-Negative Bacterial Infections, Antimicrob Agents Chemother 15: 50 (1979).
69. Stewart D, Bodey G P, LeBlanc B: In Vitro Studies of Netilmicin, a New Aminoglycoside Antibiotic, Antimicrob Agents Chemother 11: 1017 (1977).
70. Thrupp L D: Susceptibility testing of antibiotics in liquid media "V Lorian (ed): Antibiotics in Laboratory Medicine 2.baskı" kitabında s 93, William & Wilkins, Baltimore, USA (1986).
71. Töreci K: Antibiyotik direnç mekanizmaları, ANKEM Derg 3: 445 (1989).
72. Töreci K: Kemoterapötiklere direnç mekanizmaları, KÜKEM Derg 9: 41 (1986).
73. Töreci K: Sefalosporinler: I.Tarihçe, yapı, etki mekanizması, gruplandırma ve direnç mekanizmaları, ANKEM Derg 1: 90 (1987).
74. Wallhäüßer K H: Praxis der Sterilisation-Desinfektion-Kon-servierung-Keimidentifizierung-Betriebshygiene, 3.neubearb u erw Aufl, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1984).
75. Watanakunakorn C: In Vitro Activity of Ceftriaxone Alone and in Combination with Gentamicin, Tobramycin and Amikacin Against Pseudomonas aeruginosa, Antimicrob Agents Chemother 24: 305 (1983).
76. Woods D E: Pathogenesis of Acute and Chronic Pseudomonas aeruginosa Infections, Antibiot Chemother 39: 160 (Karger, Basel, 1987).

77. Yalçın H, Swenson S, Akalın H E, Baykal M: Hacettepe Üniversitesi Hastanelerinde hastane infeksiyonları: 1988, ANKEM Derg 3: 177 (1989).
78. Zak O: Antibiotics and Pseudomonas aeruginosa "L D Sabath (ed): Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes, and their treatment" kitabında s 133, Hans Huber Publishers, Bern (1980).

