

1535

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(Sağlık Bilimleri Enstitüsü)

FARKLI GRUPLARDAN ANTİBİYOTİKLERİN
KLİNİKDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* LERİN
ÜS CİNSİNDEN ÜREMELERİNE ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
(BİLİM UZMANLIĞI : MS)
SELİM UZUNOĞLU

İZMİR-1985

T. C.
Yükseköğretim Kurumu
Dokümantasyon Merkezi

T E Ő E K K Ū R

Yüksek Lisans eğitimim boyunca yetişmemde emeği geçen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Başkanı Danışman Hocam Doç.Dr.Orhan TERZİOĞLU'na, örneklerin alınmasına izin veren Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Melahat OKUYAN'a bilimsel tartışmalarda katkıda bulunan Yard.Doç.Dr.Hakkı BAHAR'a, Yard.Doç.Dr. Nedim ÇAKIR'a teşekkürü borç bilirim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
A - GENEL BİLGİLER	
A-1. Escherichia coli Genel Özellikleri	1
A-1.1 Escherichia coli'de Üreme ve Üreme Eğrisi.....	4
A-2. Antibiyotikler	
A-2.1 Antibiyotiklerin Genel Özellikleri.....	10
A-2.2 Beta-laktam Antibiyotikler.....	11
A-2.3 Tetrasiklinler.....	14
A-2.4 Aminoglycosidler.....	15
A-3. Bakterilerde Antimikrobiyal Maddelere Dirençlik.	
A-3.1 Bakterilerde Dirençlilik.....	17
A-3.2 Bakterilerde Dirençliliğin Biyokimyasal Temeli..	17
A-3.3 Bakterilerde Direnç Kazanma Yolları.....	18
A-4. İnvitro Antibiyotik Hassasiyeti Ölçme Yöntemleri	
A-4.1 İnvitro Antibiyotik Hassasiyeti Ölçme Yöntemlerinin Genel Özellikleri.....	21
A-4.2 Disk-Diffüzyon Yöntemi.....	22
A-4.3 Agar Plak Dilüsyon Yöntemi.....	22
A-4.4 Tüp Dilüsyon Yöntemi.....	23
A-5. Amaç.....	25
B - GEREÇ VE YÖNTEM	
B-1. Araştırmada Kullanılan Bakteriler.....	26
B-2. Üretim Ortamları.....	27
B-3. Antibiyotikler.....	27
B-4. Bakteri Sayısının Saptanması İçin Uygun Dalga Boyu Seçimi.....	28

III

Sayfa

B-5.	Bakteri Üretim Sistemi.....	29
B-6.	Üreme Eğrisinin Çizimi ve Standardizasyonu.....	31
B-7.	Deney Setinin Hazırlanışı.....	32
B-8.	Antibiyotikli Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrilerinin Çizimi.....	33
B-9.	Bakteri Üretim Sisteminin Kontrolü.....	34
C -	BULGULAR	
C-1.	Bakteri Sayısının Saptanmasında Kullanılan Dalga Boyu.....	35
C-2.	Bakteri Üretim Sistemine Ait Bulgular.....	36
C-3.	Antibiyotikli Sıvı Besiyerinde Escherichia coli Suşunun Üreme Eğrileri.....	36
D -	TARTIŞMA VE SONUÇ	51
E -	ÖZET	60
E-1.	SUMMARY	61
F-	KAYNAKLAR	62

Ş E K İ L L E R

	<u>Sayfa</u>
Şekil-1. Escherichia coli.....	1
Şekil-2. Escherichia coli'nin Hücre Duvarı.....	4
Şekil-3. Kompozisyonu Sabit Tutulan Ortamlarda Üretilen Bakterilerin (Şematik) Üreme Eğrisi...	6
Şekil-4. Penisillinlerin Genel Yapısı.....	12
Şekil-5. Cephalosporinlerin Genel Yapısı.....	12
Şekil-6. Tetrasiklinlerin Genel Yapısı.....	14
Şekil-7. Gentamisin'in Yapısı.....	16
Şekil-8. Araştırmada Kullanılan Spektrofotometre.....	29
Şekil-9. Üretim ve Havalandırma Sistemi.....	30
Şekil-10. Escherichia coli'nin DST Broth ve Nutrient Broth'daki Üreme Eğrileri.....	37
Şekil-11. Escherichia coli'nin Standart Üreme Eğrisi.....	38
Şekil-12. Escherichia coli Suşlarının (klinik no- kn- 6082; 4496). Ampisillitli. Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrileri.....	39
Şekil-13. Escherichia coli Suşlarının (kn. 4187; 4368) Cefoperazonlu Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrileri..	41
Şekil-14. Escherichia coli Suşlarının (kn. 3753; 4496) Cefoperazonlu Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrileri..	42
Şekil-15. Escherichia coli Suşunun (kn 4079) Cefoperazonlu Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrisi....	43
Şekil-16. Escherichia coli Suşlarının (kn. 4079; 4496) Oxytetrasiklinli Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrileri.....	45
Şekil-17. Escherichia coli Suşlarının (kn. 4187; 3753) Oxytetrasiklinli Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrileri.....	46
Şekil-18. Escherichia coli Suşunun (kn. 4368) Oxytetrasiklinli Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrisi.....	47

Şekil-19.	Escherichia coli Suşlarının (kn.4079; 4187) Gentamisinli Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrileri.....	48
Şekil-20.	Escherichia coli Suşlarının (kn.3753; 4496) Gentamisinli Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrileri.....	49
Şekil-21.	Escherichia coli Suşunun (kn.4368) Gentamisinli Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrisi.....	50



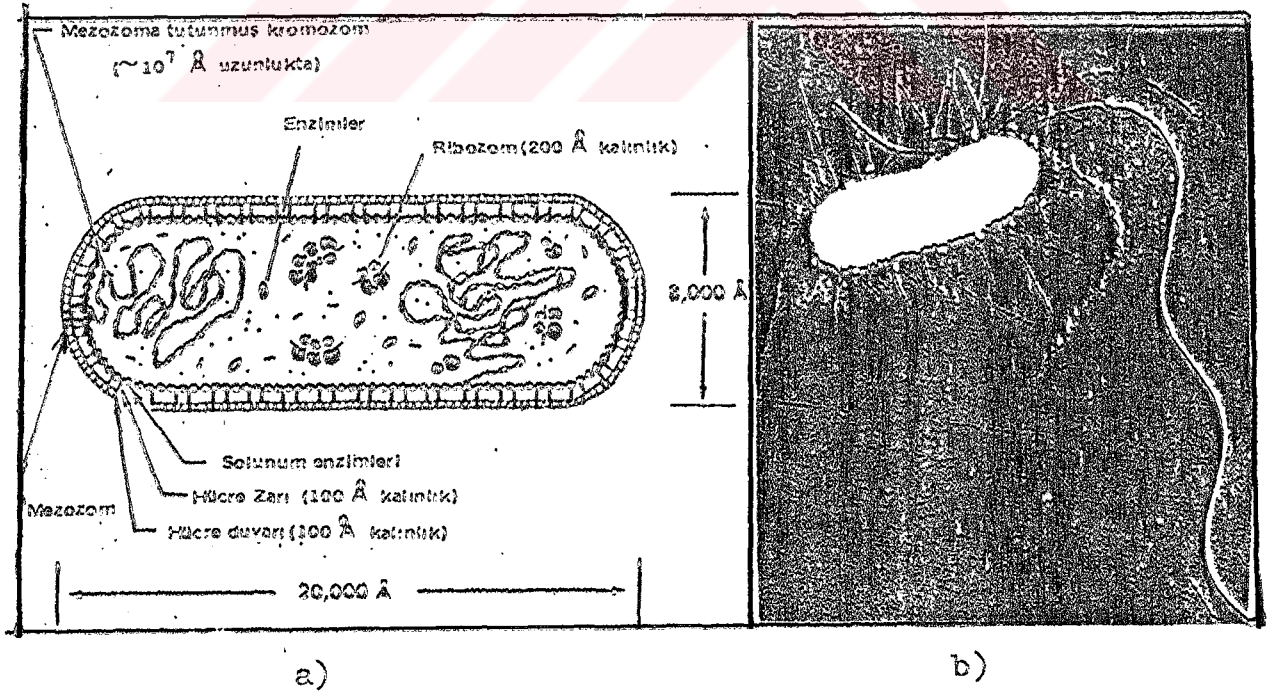
T A B L O L A R

	<u>Sayfa</u>
Tablo-I: Escherichia coli'nin Biyokimyasal ve Yapısal Özellikleri.....	2
Tablo-II: Çalışılan Antibiyotik Gruplarına karşı Bakterilerin direnç Kazanma Yolları.....	19
Tablo-III: Escherichia coli Suşlarının Klinik Numaraları, Kullanılan Antibiyotiklere Hassasiyet Sonuçları.....	26
Tablo-IV: Üretim Tüplerinin Düzeni ve İçerikleri....	32
Tablo-V: Çalışılan Antibiyotikler, Konsantrasyonları, Tüp Numaraları ve Grafiklerdeki Sembolleri.....	33
Tablo-VI: Suyu karşı DST Broth'un ve DST Broth'a Karşı Bakteri Kültürünün Spektrofotometrenin Değişik Dalga Boylarında Verdiği Optik Dansite Değerleri.....	35

A - GENEL BİLGİLER

A-1 Escherichia coli genel özellikleri :

Enterobacteriaceae familyası içinde incelenen *Escherichia coli* (*E. coli*) genellikle 2-4 mikrometre (20.000-40.000 Angström) boyunda 0,4-0,8 mikrometre (4.000-8.000 Angström) eninde, uçları yuvarlak, çomakçık görünümünde hareketli, gram olumsuz bir bakteridir (1). Bununla beraber boyutları ve morfolojisi üretildiği ortam koşullarına bağlı olarak değişebilir. İlk defa 1881 yılında Escherich tarafından bir çocuğun fecesinden izole edildiği için ilk izole edenin adına izafeten *Escherichia*, genelde kalın barsakta (kolon) yaşadıklarından dolayı da kolona ait anlamında *coli* denmektedir (2).



Sekil-1: *Escherichia coli* a) Şematik yapısı (5).
b) Elektronmikroskobunda çekilen fotoğrafı (14).

Spor ve gerçek anlamda kapsül oluşturmazlar. Çeşitli serolojik tipleri mannoza duyarlı hemaglutinasyon yapan formları vardır (1). Antimikrobiyal maddelere direnç gösterebilirler. Kromozomlarına ek olarak plasmid adı verilen kromozom dışı DNA parçaları taşıyabilirler. Özellikle kromozom dışı dirençlilik ve bunu aktarma bilgisini içeren direnç (Resistance -R-) plasmidlerine sahip formları klinik açıdan önemlidir. E.coli'nin biyokimyasal, yapısal özellikleri özet olarak verildi (Tablo I).

Dextroz Asid Gaz (+)	Glikoz (+)	Laktöz (+)	Sukroz (değişebilir)	Mannitol (+)
Sorbitol (+)	Rafinoz (değişebilir)	Süt Asit koagulyasyon.	Jelatin (-)	Hareketlilik (+)
Üreaz (-)	Indol (+)	Metil Kırmızısı (+)	Voges Proskauer (-)	Sitrat (-)
Oksidaz (-)	Lysin dekarboksilaz (-)	Ornithine dekarboksilaz (değişebilir)	Arginin dihidrolaz (değişebilir)	Lysin deaminaz (-)
H ₂ S (-)	KCN (-)	(+) : olumlu (reaksiyon verir) (-) : olumsuz (reaksiyon vermez)		

Tablo I: Escherichia coli'nin biyokimyasal ve yapısal özellikleri. (Bu sonuçlar suşlara ilaveten ortama, kullanılan tekniğe inkübasyon zamanı ve süresine göre değişebilir.) (3).

Fakültatif anaerob bakteriler olup metabolik düzenleri son elektron akseptörü olarak, öncelikle oksijeni kullanmaya yatkındır. Ancak fumarat, nitrat, dimetil sülfoksid veya trimetilamonyumoksid gibi bileşikleri son elektron akseptörü olarak kullanabilirler. Bu özellikleri sayesinde barsakta aerobik ve anaerobik koşullarda yaşayabilirler. İnce barsak duvarına tutunan, patojenik suşları epitel hücrelerindeki oksijeni kullanarak barsak floradaki diğer bakterilere karşı ekolojik avantajlar elde edebildikleri bilinmektedir (4). Genelde insan ve diğer memelilerin kalın barsağında yaşayan saprofit canlılardır. İnsanda K vitamini ve protrombin ön maddesinin sentezinde fonksiyonları vardır. İnsanın bir gram fecesinde genellikle 1×10^5 ile 1×10^8 arasında değişen sayılarda bulunurlar (4). Barsakta yaşayan diğer bakteriler ve konakçısı ile dengesi korunduğu sürece hastalık oluşturmaz. Bu denge bozulduğunda hastalık oluşturabilir. Örneğin Epidemik diyarenin en sık görülen nedenlerindedir. Barsak kanalı dışına çıkıp diğer doku ve sistemlere yerleşip koşullara bağlı olarak patojenite gösterebilirler (1;5). Üriner sistemde sessiz veya ciddi enfeksiyonlara yol açabilirler.

E.coli'nin hücre duvarı :

E.coli'nin hücre duvarı birkaç tabakadan yapılmıştır. En içte sitoplazmik membrandan periplazmik boşluk ile ayrılan peptidoglycan yapı bulunur. Peptidoglycan, tekrar eden yapılar şeklinde sıralanan asetilmuramik asit asetilglukozamin, monomerlerinin β 1-4 glikozid bağıyla bağlanmasından oluşan polisakkarid dizilerinden

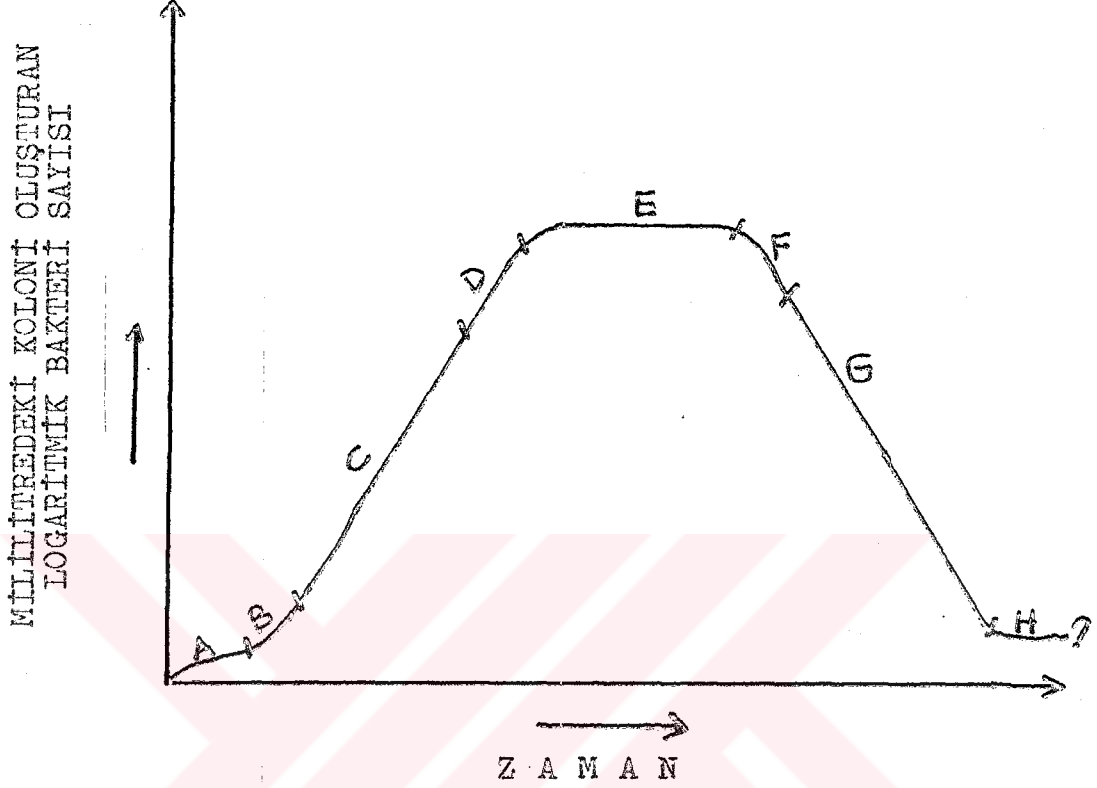
Bakterilerin üremesi ile ilgili kavramlardan "jenerasyon zamanı" bir bakteri hücrelerinin iki yavru hücre oluşturduğu ana kadar geçen süre olarak tanımlanır. "Doubling zamanı" popülasyondaki bakterilerin sayısının iki katına çıktığı süredir. Üreme hızı da birim zamandaki (saat) jenerasyon sayısı veya doubling (iki katına çıkma) sayısı olarak tarif edilir (8). Birim zaman içerisinde kompozisyon sabit tutulan ortamlarda üretilen bakterilerin üreme eğrileri, geçirdikleri morfolojik değişiklikler, metabolik aktivitelerindeki ve jenerasyon zamanlarındaki farklılıklar, koloni oluşturan bakteri sayısındaki azalmalar göz önüne alınarak dört ana döneme ayrılabilir (Şekil 3).

- Uyum dönemi (Lag Fazı)
- Üs cinsinden üreme dönemi (Logaritmik Faz)
- Kararlı-denge dönemi (Stationary Faz)
- Azalma dönemi (Death Fazı)

Bu dönemlerde kendi içinde alt dönemlere ayrılabilir. Alt dönemlerin ve geçiş dönemlerinin kesin sınırlarını çizmek gerçekte çok zordur. Bakterinin biyokimyasal ve yapısal özelliklerine, üretim koşullarına bağlı olarak değişir.

Uyum dönemi (Lag Fazı) :

Kullanılmamış hazır sıvı besiyerine nakledilen bakterilerin ortama uyum dönemidir. Gecikme ve hızlanma şeklinde iki alt döneme ayrılabilir. Gecikme, bakterilerin üremelerini sağlayacak miktarlarda madde sentezledikleri dönemdir. Hızlanma, bakterilerin bölünerek sayılarının artmaya başladığı dönem olarak tanımlanır (9;10).



Şekil-3: Kompozisyonu sabit tutulan ortamlarda üretilen bakterilerin şematik üreme eğrisi (10 nolu kaynaktan değiştirilerek).

- A : Gecikme dönemi
B : Hızlanma dönemi } Uyum dönemi
C : Üs cinsinden üreme dönemi
D : Kararlı denge döneminin başlangıcı
E : Tam kararlı denge dönemi } Kararlı denge dönemi
F : Azalma dönemi
G : Üs cinsinden azalma dönemi } Azalma dönemi
H : Yeniden düzenlenme dönemi }

Üs cinsinden üreme dönemi (Logaritmik Faz) :

Populasyondaki bakterilerin metabolik aktivitele-
rinin ve üremelerinin en üst hıza ulaştığı dönemdir (8).
Bu dönemde bakteri üremesi geometrik artış gösterir. Bu
artış yarı logaritmik grafik kağıtlarında gösterilebilir.
Mililitredeki koloni oluşturan bakteri sayısı (kob/ml)
veya buna karşılık gelen optik dansite değerleri yarı
logaritmik grafik kağıdın ordinatına ölçüm zamanı da apsi-
se işaretlenerek üreme eğrisi çizilirse, bu dönem grafikde
düz çizgi şeklinde görülür. Üretim ortamındaki maddeler
yönünden kısıtlama bulunmayan en uygun üretim koşulları-
na sahip üs cinsinden üreme döneminde, populasyondaki
bakterilerin birim zamandaki doubling sayısı, en üst üre-
me hızına (μ) ulaşıncaya kadar ortamdaki besin (substrat)
konsantrasyonuna bağımlı olarak artar. Üs cinsinden üreme,
substrat konsantrasyonu doygunluk düzeyinin altına düşün-
ceye kadar devam eder.

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$$

μ : Üreme hızı

μ_{\max} : En üst üreme hızı

S : Substrat konsantrasyonu

K_s : Doygunluk konsantrasyonu sabitesi

Bu bağıntıya göre üreme hızı en üst üreme hızının
yarısına eşit olduğunda; doygunluk konsantrasyonu sabi-
tesi ortamdaki substrat konsantrasyonuna eşittir (11).

Kültürdeki bakterilerin zararına olarak değişen
üretim koşullarına (ortamın bileşimi, substrat konsant-
rasyonu, metabolik ürünler, ortamın pH'sı O_2 ve CO_2

konsantrasyonu v.b.) bakteriler fenotiplerini ve metabolik aktivitelerini değiştirerek uyum sağlarlar (12;13). Oksijen hariç ortamdaki maddeler yönünden kısıtlama bulunmayan koşullarda üretilen aerobik bakteriler 1×10^7 kob/ml.ye ulaştığında, doubling zamanları uzamaya başlar. Bu koşullarda çoğalan bakterilerin buldukları ortama oksijen gönderilirse, doubling zamanlarındaki uzama önlenir. Ayrıca üs cinsinden üreme döneminin devamı sağlanır (14).

Kararlı denge dönemi (Stationary Faz) :

Başlangıç ve tam kararlı denge dönemi olarak iki alt dönemde incelenebilir. Başlangıç döneminde ortamdaki besin maddelerinin azalmaya başlaması ve metabolizma artıklarının çoğalması doubling zamanının uzamasına neden olur. Tam kararlı denge döneminde, üreyen bakteri sayısı, ölen bakteri sayısı ile dengelendiğinden canlı bakteri sayısında artış gözlenmez (11;14).

Azalma dönemi (Death Fazı) :

Populasyonda koloni oluşturan bakteri sayısındaki azalmanın artmaya başladığı dönemdir. Koloni oluşturan bakteri sayısındaki azalmaya göre; azalma, üs cinsinden azalma ve yeniden düzenlenme alt dönemlerine ayrılabilir. Yeniden düzenlenme alt döneminde ortamda kalan çok az sayıdaki koloni oluşturan bakteri, birkaç ay daha yaşayabilir (8; 9; 10).

Bakterilerin üreme eğrisi üzerinde çalışılırken inokulumun alındığı kültürün üretim koşulları, üreme hızı, üreme dönemi, yeni besiyerine ekilen bakterilerin üremesini

etkileyebileceği dikkate alınmalıdır. Örneğin kararlı denge dönemindeki bakteri kültüründen inokulum yapılırsa değişik hücre duvarı özelliklerine sahip heterojen bakteri topluluğu ile üretime başlanılır. Üs cinsi üreme döneminden inokulum yapılırsa, bakteriler alındığı kültürün doubling zamanında çoğalmalarını sürdürürler. Ayrıca hücre duvarı özellikleri açısından homojen ve genç bakterilerle üretim sürdürülür (13).



A - 2

A N T İ B İ Y O T İ K L E R

A-2.1 Antibiyotiklerin Genel Özellikleri :

Antibiyotikler, düşük konsantrasyonlarda kendilerine hassas mikroorganizma popülasyonlarının üremesini engelleyen, moleküler ağırlıkları genelde düşük (en fazla birkaç bin dalton) mikrobiyal kökenli metabolitler olarak tanımlanmıştır (6). Bu tanım son yıllarda üretilmeye başlanan sentetik antibiyotikleri içine almamaktadır. Ayrıca üremeleri, yüksek antibiyotik konsantrasyonlarında engellenebilen dirençli suşların varlığı "düşük konsantrasyon" ifadesini tartışılabilir hale getirmektedir. Bazı özellikleri antibiyotiklerin, konakçıya daha az zarar verecek şekilde mikroorganizma popülasyonlarının üremesini engellemede veya öldürmede kullanılabilmelerini sağlamıştır. Özet olarak bunlar;

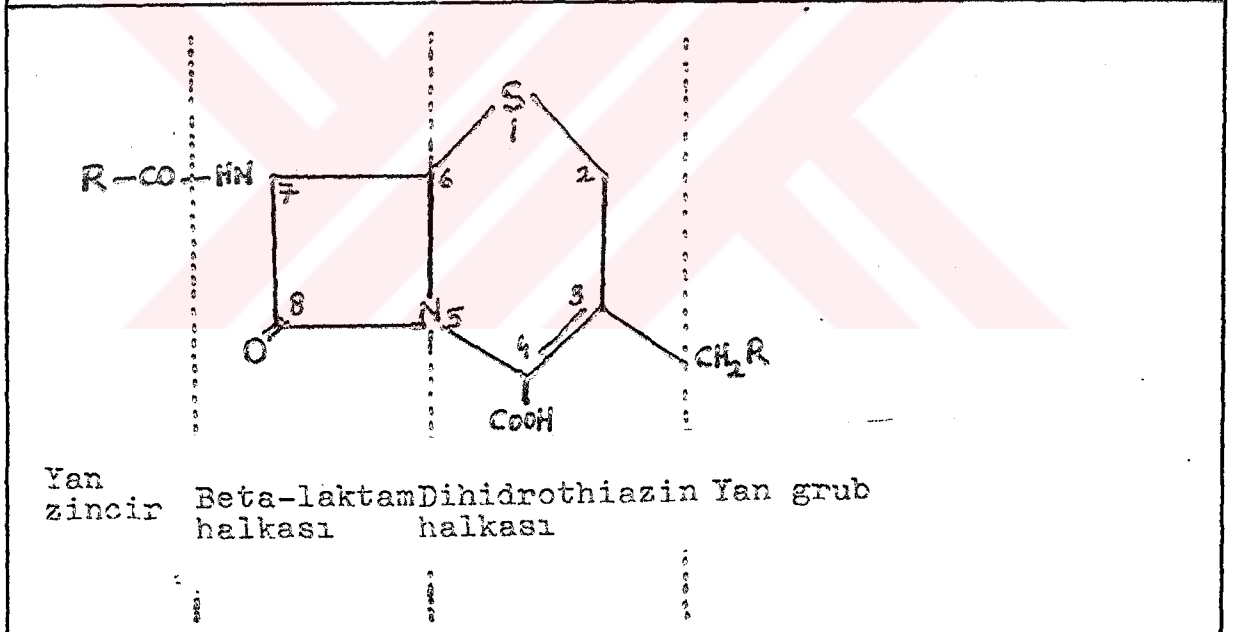
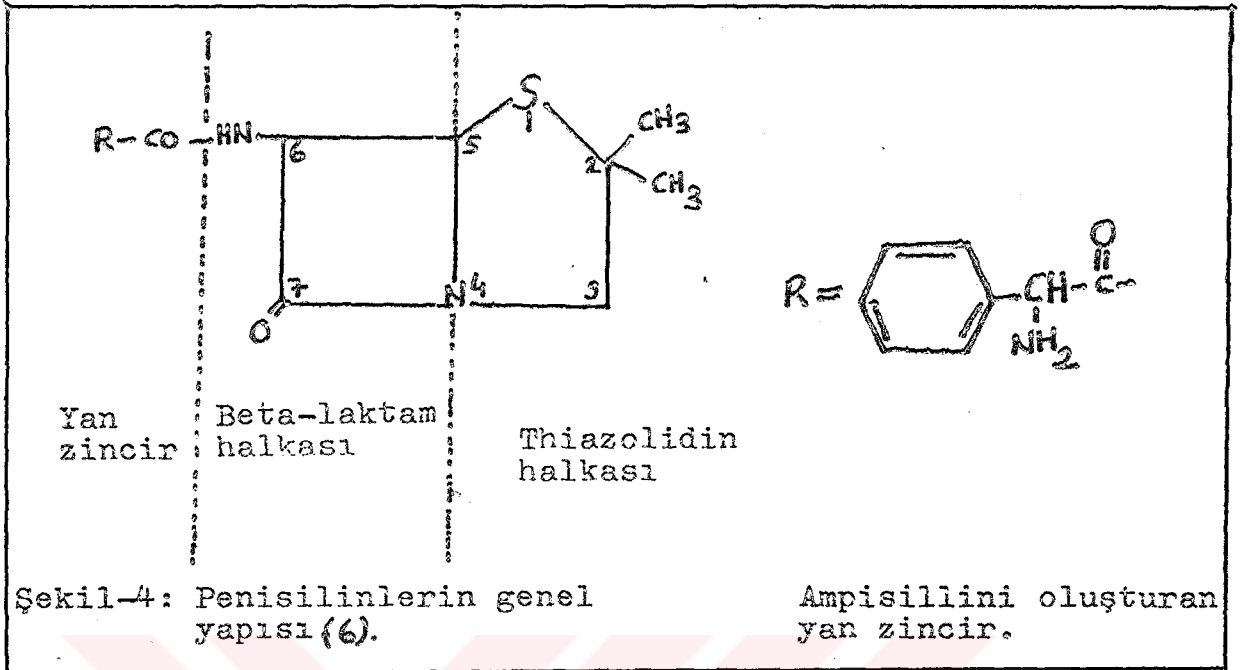
- Farklı sınıflardan organizmaların hücre ve dokularına nüfuz etme düzeylerindeki farklılıklar,
- Mikroorganizmalara özgü yapılardan hücre duvarına etki etmeleri.
- Farklı yapı ve özellikteki hücrelerde aynı fonksiyonu görmesi clası molekül ve yapıların antibiyotiklere farklı affiniteleridir (6).

Tedavide başarılı sonuç alınması antibiyotiklerin; bakteri tarafından hücre içine alınmalarına, Hücre içi hedef molekülün yapısına katılmalarına, Yaşam için mutlak zorunlu fonksiyonu yürüten yapıyla etkileşmelerine, Bu yapının veya

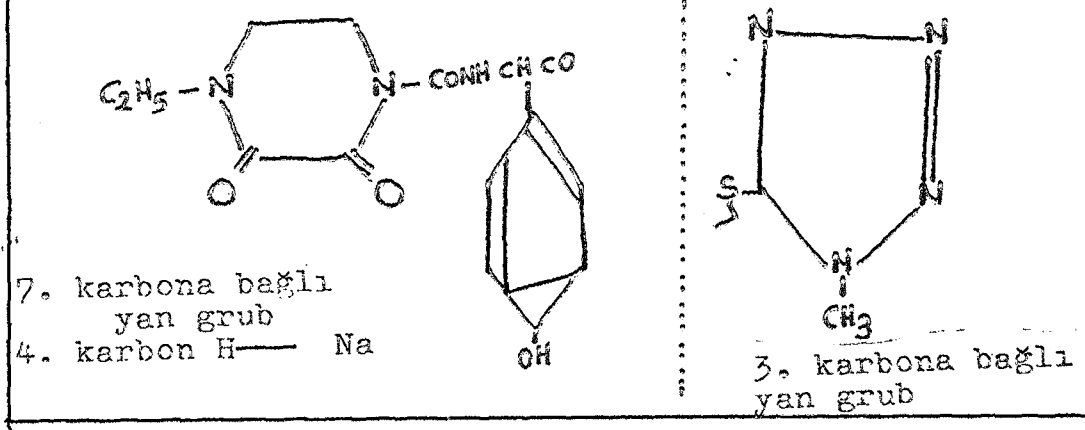
molekölün işlevsel özelliğinin, işlevinin engellenmesine bağlıdır. Bu basamaklardan biri engellendiği halde, mikroorganizma topluluğu hala canlılığını veya üremesini sürdürebiliyorsa kullanılan antibiyotik, mikroorganizmaları etkilese bile tedavi ve koruyuculuk açısından yararsızdır (6). Tedavi ve koruyucu amaçlarla kullanılan antibiyotikler konakçıya da zarar verebilir. Bundan dolayı antibiyotik seçimi yaparken konakçının yaşı, fizyolojik durumu, antibiyotiğin etki mekanizması ve kullanılacak dozları dikkate alınmalıdır. Antibiyotikler bakteriler üzerindeki etkilerini, onların üremelerini engelleyerek (bakteriyostatik), öldürerek (bakterisidal) veya onları morfolojik değişikliklere uğratarak gösterirler(15). Antibiyotiklerin bakteri morfolojisini değiştirebilme özelliklerinin klinik açıdan önemli olduğu üzerine son yıllarda yayınlar çıkmaya başladı (29).

A-2.2 Beta-laktam Antibiyotikler :

Bu sınıfa dahil antibiyotikler isimlerini yapılarında bulunan Beta-laktam molekülünden alırlar. Beta-laktam molekülü dört atomlu bir halkadan oluşan siklik amiddir. Aynı zamanda antibiyotiğin etken kısmını oluşturur. Beta-laktam antibiyotikler penisilinler ve sefalosporinler olmak üzere iki ana grubda incelenirler. Beta-laktam halkasının bağlandığı yapılar her iki grubda farklıdır. Beta-laktam halkası penisilinlerde beş atomlu thiazolidin halkasına, sefalosporinlerde altı atomlu dihidrothiazin halkasına bağlıdır (Şekil 4-5). Yapısal ve fonksiyonel özellikleri açısından penisilin ve sefalosporinler daha alt grublara ayrılarak da incelenmektedir (6; 16; 17).



Şekil-5: Cephalosporinlerin Genel Yapısı. (üstte) (6). Cefoperazonu oluşturan yan gruplar (altta) (21).



Beta-laktam halkası kimyasal ya da enzimatik yollarla açılırsa antibiyotik etkinliğini kaybeder. Penisillinlerde altıncı karbona bağlı yan grub, Cephalosporinlerde ise yedinci ve üçüncü karbona bağlı yan gruplar değişikliğe uğratarak önceki antibiyotiklere nazaran Beta-laktam halkaları zor açılan yeni antibiyotik türevleri geliştirilmektedir.

Bakterilerde hücre duvarı sentezi sırasında peptidoglycan yapının olgunlaşmasında, transpeptidaz ve karboksipeptidaz adlı iki enzim iş görür. Beta-laktam antibiyotikler bu iki enzimin fonksiyonunu engellerler. Dolayısıyla peptidoglycan yapının olgunlaşması önlenir. Çoğalan bakterilerin iç membranlarında Beta-laktam antibiyotiklerin özgül şekilde bağlandığı proteinler penisilline bağlanan proteinler (PBP_g) olarak isimlendirilir. Bu proteinlerin transpeptidaz ve karboksipeptidazın, farklı formları olabileceği düşünülür (6). Beta-laktamlar bakterisid etki gösteren antibiyotikler olarak tanımlanır. Ancak bu özellik her zaman geçerli olmayıp şartlara göre değişebilmektedir.

Ampisillin (Ampisina) :

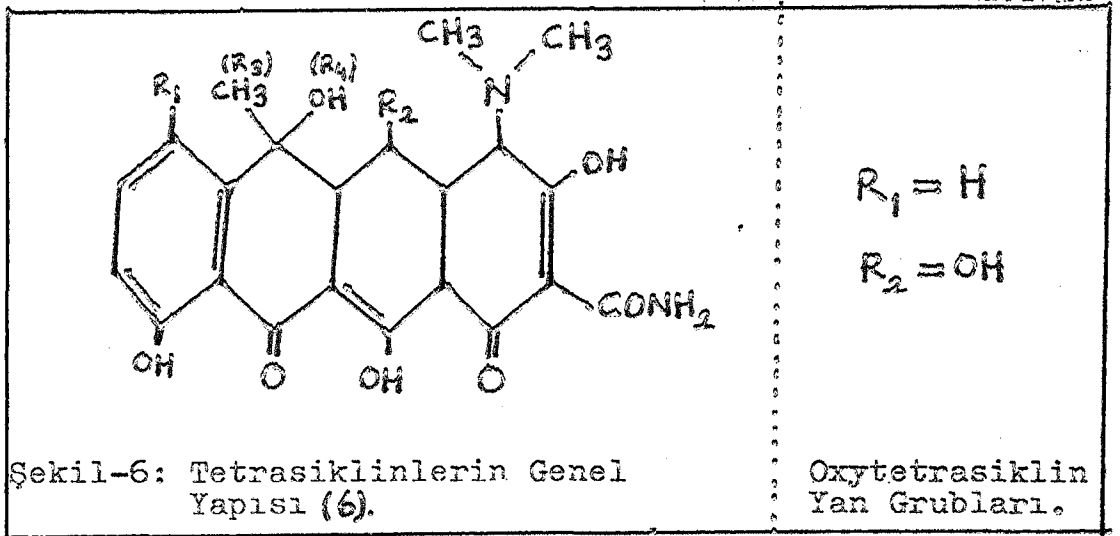
Penisillin grubu yarı sentetik bir antibiyotiktir. Penisillanik asid ve (1)-2-aminofenilasetik asid-den hazırlanır. Su içeren çeşitli formları vardır. Trihidrat formu renksiz, kristal şeklindedir (18). Geniş spektrumlu antibiyotik olarak bilinir. Sağlıklı erişkin kişilere intramuskular (IM) ya da Intravenöz (IV) yolla 250 mg/günde verilirse 2 saat sonra serum düzeyleri 2-3 µg/ml ye ulaşır. (19).

Cefoperazone (cefobid) :

Üçüncü kuşak cephalosporinlerden yarı sentetik bir antibiyotiktir. Beyaz kristalimsi toz şeklinde olup suda kolay erir. İlk labratuvar ve tedavi bulguları geniş spektrumlu bir antibiyotik olduğunu göstermiştir. Beta-laktamazların belirli tiplerine dirençlilik gösterebilirler. Sağlıklı erişkin kişilere bir gram intramuskular yolla verildiğinde enjeksiyondan bir saat sonra serum düzeyleri 74 µg/ml'ye ulaşır. (20;21)

A-2.3 Tetrasiklinler :

Bu sınıf antibiyotiklerin temel kimyasal yapıları lineer şekilde birbirleriyle bağlantılı dört halkadan meydana geldiğinden Tetrasiklin olarak isimlendirilirler (Şekil 6). Asetat ve malonat birimlerinin kondanse olması sonucunda elde edilen zincirin siklik yapıya dönüşümü, mikroorganizmalarda gerçekleştirilir (6). Beşinci, altıncı, yedinci karbondaki yan grublara (R) değişik moleküller takılarak çeşitli türevleri elde edilebilir.



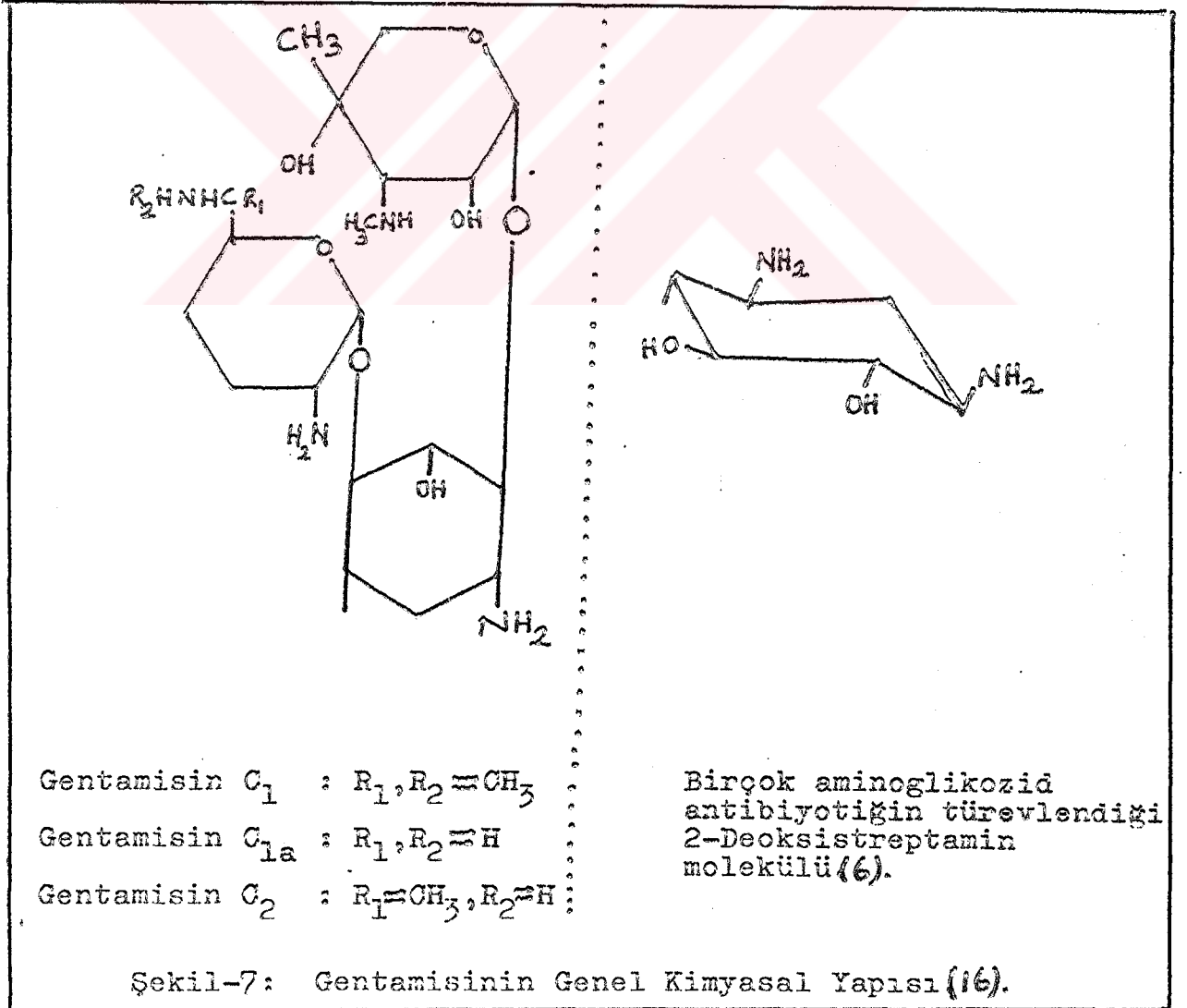
Protein sentezinin başlangıç kademesinde, aminoasil t RNA'nın bakteri ribozomunun 30 s'lik alt birimine bağlanmasını engelleyerek protein sentezinin durmasına yol açarlar. Bakteriyostatik etkilidirler. Kendi aralarında kross-dirençlilik gösterirler. Protein sentezini engelleme süreleri en azından antibiyotiğin konsantrasyonuna ve ortamdaki koloni oluşturan bakteri sayısına göre değişir.

A-2.4 Aminoglycosidler :

Siklik amino alkole birkaç tane amino şekerin bağlanmasıyla meydana gelen yapıları karakteristikdir. Amino alkol ve amino şekerler glukozdan türevlenir. Kimyasal açıdan Glikozil grubları taşıyan aminocyclitol yapılarındadırlar. Suda kolay erirler. Aminocyclitollerin farklı gruplarından farklı aminoglycosid antibiyotikler sentezlenir. Genelde aktif taşıma ile hücre içine alınırlar (6). Etki mekanizmaları kesin olarak bilinmemekle beraber protein sentezini birkaç yönden durdurabilirler. Ribozomun 30 s'lik alt biriminde yer alan aminoasit bölgesini bozarak, aminoasil t RNA'nın aminoasit bölgesine doğru yerleşimini engelleyebilirler. Protein sentezinin normal döngüsünü bozup büyüyen, peptid zincirine yanlış aminoasit katılmasına yol açabilirler. Sentezlenen hatalı ya da eksik aminoasit içeren proteinler bakterinin hayati metabolik fonksiyonlarıyla ilgili ise bakterinin ölümüne de neden olurlar. Genelde bakterisid etki gösteren antibiyotiklerdir(16).

Gentamisin (Garamisin) :

Tedavide çok kullanılan Garamisin, Gentamisinin C_1 , C_{1a} ve C_2 formlarının karışımını içerir. Gentamisin 2-Deoksistreptamin türevidir (Şekil 7). Literatürlerde geniş spektrumlu bir antibiyotik olduğu bildirilir. Kullanıldıklarında nefrotoksik etki gösterebilirler. Bu yüzden ciddi enfeksiyonlarda hekim kontrolünde alınması önerilir (10). Sağlıklı erişkin kişilere günde üç kere 80-150 mg. dozları IM veya IV yolla verildikten bir saat sonra serum düzeyleri yaklaşık 2-8 $\mu\text{g/ml}$ 'ye ulaşır (6;8;19).



A - 3 BAKTERİLERDE ANTIMİKROBİYAL MADDELERE
(ANTİBİYOTİKLER) DİRENÇLİLİK

A - 3.1 Bakterilerde Dirençlilik:

Bakterilerin üredikleri ortama belirli bir konsantrasyonda antibiyotik ilave edildiğinde, üremeleri engellenemiyorsa bakteriler o koşullarda antibiyotiğin o konsantrasyonuna dirençli kabul edilirler. Ancak dirençlilik, bakteri süşuna, süşun özelliklerine, ortamdaki koloni oluşturan bakteri sayısına, antibiyotiğin özelliğine, konsantrasyonuna ve üretim koşullarına bağlı olarak değişebilir. Bir popülasyondaki bakteriler farklı antibiyotik konsantrasyonlarına maruz bırakıldıklarında üremelerinin engellendiği en düşük konsantrasyona, minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) denir. Ölümüne yol açabilen en düşük antibiyotik konsantrasyonuna da minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) denir.

A - 3.2 Bakterilerde Dirençliliğin biyokimyasal temeli :

Bakteriler antimikrobiyal maddelere değişik biyokimyasal yollarla dirençlilik gösterebilirler. Özet olarak:

- Antibiyotiğin etken kısmının kimyasal veya enzimatik yollarla inaktif şekle dönüştürülmesi.
- Antibiyotiğin hücre içinde bağlandığı molekülün değişikliğe uğratılması.
- Bakterinin antibiyotiğe olan geçirgenliğinin değişmesi.
- Antibiyotiğin fonksiyonunu engellediği molekülün daha fazla sentezlenerek yerine konması (6).

A-3.3 Bakterilerde direnç kazanma yolları :

Bakterilerin antimikrobiyal maddelere gösterdikleri direnç, genetik yapılarında bulunan veya diğer bakterilerden kazanılan dirençlilik bilgisinin hücre içi ve dışı çevreyle etkileşmesi sonucunda ortaya çıkar. Dirençlilik bilgisi, bakterinin kromozomlarında veya bakterinin ekstrakromozomal yapılarından direnç plazmidlerinde bulunur. Antimikrobiyal maddelere gösterilen dirençlilik değişik yollarla (konjugasyon, transformasyon, transdüksiyon) diğer bakterilere aktarılabilir (24). Bakteriler dirençlilik ve bunu aktarabilme bilgisini içeren R plazmidlerine sahip olabilirler. R plazmidinin, diğer bakterilere aktarılma kinetiği bakteri kromozomunun aktarılma kinetiğine göre daha yüksek olduğundan, R plazmidi diğer bakterilere daha hızlı aktarılabilir. Bu şekildeki bir aktarım, dirençli suşların sayısının artmasını hızlandırabileceği gibi klinik açıdan önemli problemlere de yol açabilir. Ayrıca antibiyotiklerin gereksiz ve aşırı kullanımı popülasyondaki dirençli suşların seçilimi, ortaya çıkışı üzerinde seçici bir baskı da oluşturabildiği bilinmektedir (22).

Bakteriler penisillin ve cephalosporin grubu antibiyotiklere değişik yollardan direnç gösterebilirler. Beta-laktamaz üretebilmeleri, hücre içi hedef moleküllere veya yapılara antibiyotiğin tutunmasını engelleyici nonhidrolytik engel oluşturabilmeleri, iç ve dış çevresi arasında madde alışverişini düzenleyen dış membranlarının geçirgenliğinde değişiklik yapabilmeleri başlıcalarıdır (25).

Tetrasiklin ve aminoglycosid grubu antibiyotikler genelde aktif taşıma ile hücre içine alındıklarından, aktif taşıma sistemini etkileyen bir mutasyon her ikisinin ya da birinin bakteri içine alınmasını engelleyebilir. E.coli'nin hücre duvarı, yapısı gereği, doğal engelleyici özellik de gösterir. Dış membranın hidrofilik ve hidrofobik yüzeylerinin özgül yapısı, dış ortamla madde alış-verişini sağlayan belirli büyüklükteki porları (porin) antibiyotiklere direnç göstermede etkili olabilir. Örneğin, dış membranda bulunan lipopolisakkaridlerin karbonhidrat bileşenlerinin veya porları oluşturan proteinlerin biyosentezi sırasında meydana gelen mutasyonlar dirençliliğin artmasına ya da azalmasına yol açabilir (24). Araştırmada kullanılan antibiyotik gruplarına karşı bakterilerin gösterdikleri dirençlilik mekanizmaları özet olarak Tablo-II'de verilmiştir.

Antibiyotik Grubu	Mekanizma tipi	Genetik Belirleyicinin Yeri	Mekanizmanın Tanımı
Penisilin ve Cephalosporin	İnaktivasyon	Extra kromozomal Kromozomal,	Beta laktamaz üretimi
	Intrinsic	Kromozomal	Methisiline - dirençlilik
Beta-laktam Antibiyotikler	Tolerans	Bilinmiyor	Düşük MİK yüksek MBK değerine sahip suşlar,
Tetrasiklinler	Hücreci Geçirgenlik	Extrakromozomal	Geçirgenliğin Düşük hızda olması (kısmen uyartılabilir)
Aminoglycosidler	İnaktivasyon	Extrakromozomal	N-Asetilasyon Fosforilasyon Adenilasyon

Tablo-II: Çalışılan antibiyotik gruplarına karşı bakterilerin direnç kazanma yolları(6).

Bakterilerin yukarıda kısaca açıklanan mekanizmalarla kazanabildikleri dirençliliğin piyasaya yeni çıkan Beta-laktam ve aminoglycosid türevi antibiyotikler dahil tüm antibiyotikleri içine alması kuvvetli bir olasılıktır. Bundan dolayı, antibiyotiklerin özellikle hastahane çevresinde yerinde ve gerekli miktarda kullanımının sağlanması gerektiğine inanılmaktadır. Aksi takdirde, dirençli bakteri suşlarının seçilimini ve yayılımını artırıcı yönde bir ortam oluşturulur ki bu da antibiyotiklerin tedavi ve koruyucu amaçlarla kullanım verimliliğini azaltır (22).

Antibiyotiklerin çeşitliliği, sayısı ve kullanımı giderek artmaktadır. Son veriler tüm antimikrobiyal maddelere dirençlilik gösteren enterik bakterilerin sıklığının giderek arttığını göstermektedir (22; 23). Günümüzde, antimikrobiyal maddelere direnç gösteren mikroorganizmalarla mücadelede değişik yollar kullanılmaktadır. Daha etkili ve mevcut dirençlilik mekanizmalarından etkilenmemesi için yeni antibiyotik türevlerinin geliştirilmesi, mevcut ilaçların doğru ve etkin şekilde kullanılması için toplumun eğitimi, invitro antibiyotik hassasiyeti ölçme yöntemlerinin standardize edilerek klinisyene doğru ve güvenilir bilgi verilmesi başlıcalarıdır (22). Bu mücadele yollarından hangisinin daha etkili ve önemli olduğu tartışmaya açık bir konudur.

A-4 İNVİTRO ANTİBİYOTİK HASSASİYETİ ÖLÇME
YÖNTEMLERİ

A-4.1 İnvitro Antibiyotik Hassasiyeti Ölçme Yöntemlerinin
Genel Özellikleri

En etkili ajanı, uygun dozunu saptamak, bakterilerin dirençlilik kazanma tehlikesini en alt düzeyde tutabilmek ve daha ucuz fiyatlarla halkın tedavisini sağlayabilmek düşüncesiyle invitro antibiyotik hassasiyeti ölçme yöntemleri geliştirilmektedir. Bu yöntemlerin standardizasyonu, sonuçların invivo koşullara uygunluk düzeyi günümüzde daha da önem kazandı (26). İnvitro yöntemlerle elde edilen bulgular, invivodaki enfeksiyon etkeni bakterilere karşı antibiyotiklerin etkisi üzerine labratuvar bilgisi sağlar. Labratuvar ölçümlerinin yanında hastanın da takibi yapılırsa invivo koşullara uygunluk düzeyi artırılıp, tedavide istenilen başarıya ulaşılabılır.

Klinik teşhis labratuvarlarında genelde üç yöntem kullanılır:

- Disk-Diffüzyon Yöntemi
- Agar Plak Dilüsyon Yöntemi
- Tüp Dilüsyon Yöntemi

Her yöntemin avantajları ve sınırlı yönleri vardır. Çalışmanın amacına göre uygun olanı seçilmelidir.

A-4.2 Disk-Diffüzyon Yöntemi :

Bu yöntemin Kirby-Bauer, Stokes ve Ericsson olmak üzere üç değişik şekli vardır. Yöntemin bu üç şekli temelde aynı olmakla beraber küçük ayrılıklar gösterir. Genel olarak test edilecek bakteri popülasyonundan uygun katı besi yerine semi-konfluent üreme gözlenecek sayıda ekim yapılır. Belli konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş diskler plağa uygun aralıklarla yerleştirilir. Optimum sıcaklıkta yeterince inkübe edildikten sonra, her diskin etrafında oluşan inhibisyon zonu çapları ölçülür. Ölçülen inhibisyon zonu çapları, değerlendirme kartındaki değerler ile karşılaştırılır. Değerlendirme kartından bakterinin antibiyotiklere hassasiyet düzeyi saptanır. Bu yöntemin basitliği, ekonomikliği ve standardize edildiği durumlarda doğru sonuçlar elde edilebilmesi klinik teşhis laboratuvarlarında yaygın şekilde kullanılmasına neden olmaktadır (17; 19; 27).

A-4.3 Agar Plak Dilüsyon Yöntemi :

Antibiyotiklerin ikişer katlı azalan konsantrasyonları (100, 50, 25, 12,5 ...) uygun sulandırım sıvısında seyreltilerek hazırlanır. Plaklara katı besi yerini dökme sırasında antibiyotiğin farklı konsantrasyonları plaklara ilave edilir. Değişik antibiyotik konsantrasyonlarını içeren plaklara test edilecek bakteriden yaklaşık aynı sayıda ekim yapılır. Optimum koşullarda inkübasyondan sonra üremenin gözlenmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonunu içeren plak saptanır. Plakdaki konsantrasyon bakterinin MİK değeri olarak tanımlanır.

A.4.4 Tüp Dilüsyon Yöntemi :

Antibiyotiklerin ikişer katlı azalan konsantrasyonları yine aynı şekilde hazırlanır. Bakterileri üretmek için sıvı besiyeri kullanılır. Hassasiyeti belirlenerek bakteri kültüründen, değişik antibiyotik konsantrasyonlarını ve sıvı besiyerini içeren tüplere yaklaşık aynı sayıda inokulum yapılır. Yeterince inkübe edildikten sonra tüplerde üremenin varlığı çıplak gözle bulanıklık gözlenerek saptanır. Bulanıklık üremenin göstergesi olarak alınır. Daha doğru sonuçlar elde etmek için spektrofotometre kullanılabilir. Üretim tüplerinde bakterilerin verdiği bulanıklık, hem mililitredeki koloni oluşturan bakteri sayısı (kob/ml) karşılığı hem de o sayıya denk gelen optik dansite karşılığı standardize edilebilir. Mililitredeki koloni oluşturan bakteri sayısını ve buna karşılık gelen optik dansite değerlerini gösteren bakteri üreme eğrisi çizilip standardize edilirse, üremenin varlığı optik dansite okunarak saptanabilir. O zaman tüp dilüsyon yöntemi, Turbidometrik yöntem (bulanıklık ölçümü) adını alır. Üremenin gözlenmediği en az antibiyotik konsantrasyonunu içeren tüpdeki konsantrasyon bakterinin MİK değeri olarak tanımlanır.

Üretim ortamında antibiyotik tarafından birim zamanda öldürülen koloni oluşturan bakteri sayısı iki şekilde tayin edilebilir. Koloni oluşturan bakteri sayısı bilinen bakteri kültürü değişik antibiyotik konsantrasyonlarına maruz bırakılır. Belirli zaman aralıklarında antibiyotiği uzaklaştırıp -uygun dilüsyonlardan- plaklara ekim yapılır. Uygun inkübasyon sonunda plaklarda oluşan koloniler sayılır.

Dilüsyon faktörü ile çarpılarak birim hacimde bulunan koloni oluşturan bakteri sayısı belirlenir. Başlangıçta ortama ekilen koloni oluşturan bakteri sayısından bu değer çıkarılarak öldürülen canlı bakteri sayısı saptanabilir. Veya dolaylı olarak popülasyonun birim hacimdeki bakteri sayısını verebilecek değişkenlerden (bulanıklık v.b.) yararlanılarak saptanır. Spektrofotometre 1×10^7 kob/ml aşağısında okuma yapmadığı için ancak mililitresinde 1×10^7 ve daha fazla sayıda koloni oluşturan bakteri içeren kültürlerde Turbidometrik yöntemle çalışılabilir. Turbidometrik yöntem kullanılarak üs cinsinden üreme dönemindeki bakteri kültürlerine antibiyotiklerin etkisinin bir saat onbeş dakika içinde saptanabileceği belirtilmektedir (15). MİK değerinin altındaki antibiyotik konsantrasyonlarının antimikrobiyal etkileri ile antibiyotiklerin bakterilerle kısa süreli etkileşimlerinin klinik açıdan hesaba katılması gerektiği bildirilir (29). Turbidometrik yöntem MİK değerlerinin altında çalışma yaparak antibiyotiklerin bakterilerle kısa süreli etkileşimlerini saptama imkanı da sağlar.

İn vitro koşullarda antibiyotiklerin herhangi bir bakteri popülasyonuna etkileri, en azından bakterinin yapısına ve özelliklerine, ortamdaki etkin antibiyotik konsantrasyonuna, antibiyotikden etkilenen koloni oluşturan bakteri sayısına üreme ortamının özelliğine, üreme dönemine, üreme hızına, dirençli mutantların ortaya çıkış hızına göre değişim gösterir (27). İn vitro koşullarda üretilen bakterilerin morfolojisi, fizyolojisi, hücre duvarı özellikleri, serum hassasiyeti, antijenik yapıları, fagosit hücreler tarafından

yok edilmeleri, pilus oluşturmaları, virüslensleri in vivo'da üredikleri zamankinden oldukça farklılık gösterdiği son yayınlarda bildirilmektedir (12). Bu farklılıkların bakterilerin antimikrobiyal maddelere hassasiyetini de etkileyebileceği dikkate alınmalıdır.

A-5 Amaç :

Klinikden izole edilen ürener sistem enfeksiyon etkeni 5 E.coli suşunun sürekli havalandırılan sıvı besiyerinde optimum üreme koşulları saptanıp standardize edildi. Standart üretim koşullarında E.coli kültürünün zamana karşı okunan optik dansite değerlerine karşılık gelen mililitredeki koloni oluşturan bakteri sayısı saptanıp üreme eğrisi çizildi. Farklı gruplardan antibiyotiklerin değişik konsantrasyonlarının, E.coli suşlarının üs cinsinden üremelerini zaman ve üretim koşullarına bağlı olarak nasıl etkilediği araştırıldı.

B - G E R E Ç V E Y Ö N T E M

B-1 Araştırmada Kullanılan Bakteriler :

Üriner sistem enfeksiyonundan yakınan altı hastadan izole edilip, identifikasyonu ve antibiyogramları uygun yöntemlerle yapılmış Escherichia coli suşları; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Bakterioloji Labratuvarından sağlandı. Araştırmada kullanılan antibiyotiklere dirençli suşlar MİK değerlerinin altındaki antibiyotik konsantrasyonlarına içeren yatık Diagnostic Sensitivity Test Agar'da (DST Agar) stoğa çekildi. 16 saat inkübasyondan sonra 4 °C'de saklandı.

Bakterinin Kaynağı	Antibiyo- tik Kli- nik No.	Cefoperazone Sodyum (75 ug)	Oxyetra siklin (30 ug)	Gentamisin (10 ug)	Ampisilin (10 ug)
İdrar	3753	Hassas	Hassas	Hassas	-
İdrar	4079	Hassas	Dirençli	Hassas	-
İdrar	4187	Dirençli	Dirençli	Hassas	-
İdrar	4368	Dirençli	Hassas	Dirençli	-
İdrar	4496	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
İdrar	6082	-	-	-	Hassas

Tablo-III: E.coli suşlarının klinik numaraları ve Kirby-Bauer Disk yöntemine göre araştırmada kullanılan antibiyotiklerin hassasiyet sonuçları.

B-2 Üretim Ortamları :

Sıvı üretim ortamı olarak Nütrient Broth (Mast Lab.İngiltere) ve DST agar'dan (oxoit ltd.İngiltere) -santrifügasyonla agar çöktürülerek- hazırlanan DST Broth kullanıldı. Katı üretim ortamı olarak Nütrient Agar (Mast lab.İngiltere) ve DST Agar kullanıldı. DST Broth eldesi için kutunun üzerinde yazılı miktarlarda DST Agar ve distile su birbiriyle karıştırılıp besiyeri hazırlandı. Beş dakika el ile çalkalandıktan sonra agarın çökebildiği hızda santrifüj (füj 315.Nüve ltd.Türkiye) ile agar çöktürülüp üstteki sıvı (DST Broth) temiz bir kabda toplandı. Hazırlanan DST Broth'un bu çalışma için uygun olup olmadığı aşağıdaki işlemler yapılarak saptandı. pH metre ile (Digital pHM 838 Nükleer Elektronik A.Ş.Türkiye) pH'sı ölçüldü. Nütrient Broth'u ve hazırlanan DST Broth'u içeren tüplere aynı E.coli suşundan eşit sayıda ekim yapıldı. 37 °C de standart koşullarda üreme eğrileri çizildi. Ek olarak, DST Broth'a agar bakteriyolojikden (oxoid ltd. İngiltere) uygun miktarda katılarak katı besiyeri oluşturuldu. Orijinal DST agar ve agar katılmış DST Broth içeren plaklarda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre aynı E.coli suşunun antibiyogramı yapıldı (19).

B-3 Antibiyotikler :

Penisilin grubundan Ampisillin (Mustafa Nevzat ilaç A.Ş. Ampisina. Türkiye); Cephalosporinlerden Cefoperazone (Pfizer,Cefobid. Türkiye); Tetrasiklinlerden Oxytetrasiklin (Pfizer, Terramycin. Türkiye), Aminoglycosid'lerden

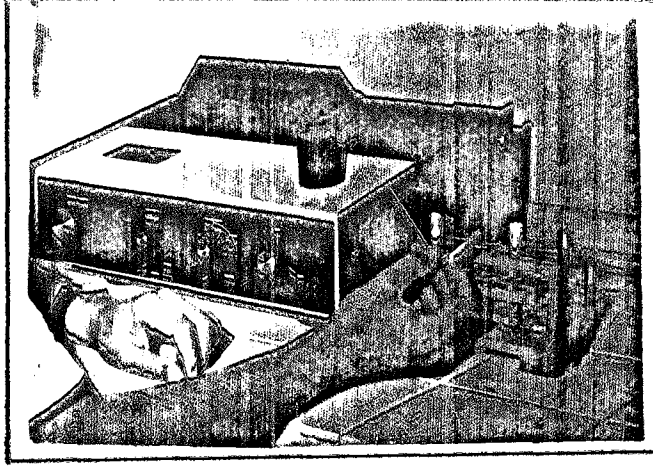
Gentamisin (Eczacıbaşı.Garamycin.Türkiye) araştırmada kullanıldı (6; 27).

Cefoperazone ve Gentamisin stok solusyonları (10 mg/ml) steril bidistile suda hazırlanıp 10 ml'lik şişelerde -20°C derin dondurucuda saklandı. Derin dondurucudan çıkarılan her stok solusyon bir defa kullanıldı. Oxytetrasiklin ve Ampisillinin solusyonları hazırlandıkları anda kullanıldı (30).

B-4 Sıvı Üretim Ortamında Bakteri Sayısının Saptanması İçin Uygun Dalga Boyu Seçimi :

Turbidometrik yöntemin kullanıldığı bu çalışmada bakteri kültürlerinin optik dansiteleri, Perkin-Elmer 35 spektrofotometrede (coleman Div.İnst. A.B.D.) okundu (Şekil 8). Uygun dalga boyu seçimi 400 nanometre (nm) ile 650 nm arasında yapıldı. İlk önce distile su sıfır ayarı olarak kullanıldı. Suyu karşı Nütrient ve DST Broth'un değişik dalga boylarında verdiği optik dansiteler okundu. Daha sonra sıfır ayarı olarak sıvı besiyeri (Nütrient Broth ve DST Broth) kullanıldı. Besiyerine karşı bakteri kültürünün değişik dalga boylarında verdiği optik dansiteler okundu. Suyu karşı sıvı besiyerinin düşük optik dansite verdiği, vasata karşı da bakteri kültürünün yüksek optik dansite verdiği kritik dalga boyu seçildi.

Spektrofotometreye uygun 95x10 mm. boyutlarındaki üretim ve optik dansite okuma tüplerinin optik dansite açısından standardizasyonu; % 0,5 CuSO_4 ; % 0,8; % 0,2 lik Orsein Solusyonu, Nütrient Broth ve bakteri içeren Nütrient Broth da



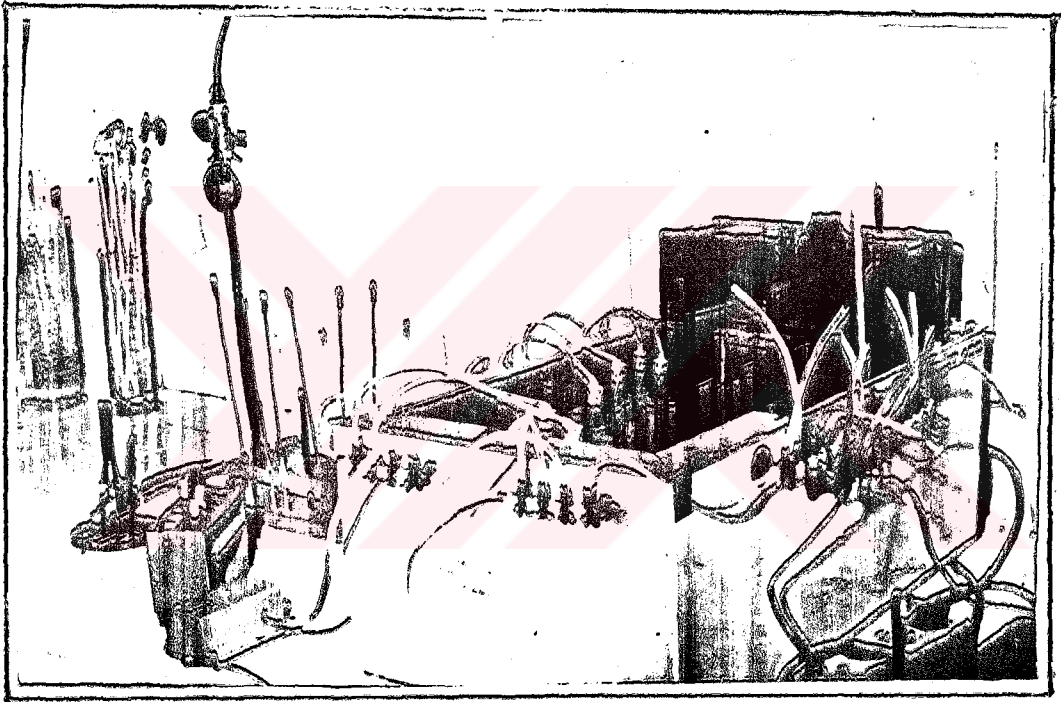
Şekil-8: Çalışmada kullanılan spektrofotometre.

yapıldı Değişik dalga boylarında her solüsyon için ayrı ayrı olmak üzere üretim tüplerinin optik dansiteleri okundu. Aynı solüsyon ve dalga boyunda aynı optik dansitenin okunduğu tüpler seçilerek grublandırıldı. Aynı optik dansitenin okunduğu tüplerin okuma yönleri cam kalemle işaretlenerek üretimde kullanıldı.

B-5 Bakteri Üretim Sistemi :

Üretim sistemi Terzioğlu'nun (1972) geliştirdiği sistem esas alınarak kuruldu. Yukarıda açıklanan şekilde optik dansite yönünden standardize edilen tüplere, uygun, ortası, delikli teneke kapaklar yaptırıldı. Üretim tüplerinin ağzına konan bu kapaklardan L şeklinde kıvrık 4,5 mm. çapında cam borular geçirilerek, bakteri kültürünün havalandırılması gerçekleştirildi. Cam borunun tüp girişine de pamuk konarak havanın sterilizasyonu sağlandı. Havalandırma akvaryum motoru (Trumpif-Türkiye) ve hava dağıtıcı sistemi ile gerçekleştirildi(Şekil-9). Bakteriler

dakikada 40, 60, 80 hava kabarcığı gönderilen sıvı besiyeri içeren tüplerde üretilerek, dakikada gönderilecek uygun hava kabarcığı sayısı saptandı. Üretim 37 ± 1 °C su banyosunda (BM 100 tipi Nüve Ltd., Türkiye) dakikada 60 ± 2 hava kabarcığı gönderilen 3,5 ml DST Broth içeren üretim tüplerinde yapıldı. Gerektiğinde sıvı besiyeri olarak Nütrient Broth'da kullanıldı.



Şekil-9 Üretim ve havalandırma sistemi.

Üretim Öncesi Bakterilerin Deneye Hazırlanışı :

Stok besiyerinden bakteriler öze ile alınıp hem Nütrient Broth hem de DST Broth'a ekildi. 37 °C'de 16 saat inkübe edildi. Bu kültürden 0,1 ml alıp içinde 3,5 ml DST Broth bulunan başka bir tüpe ekim yapıldı. Önceden belirtilen koşullarda üretim başlatıldı. Optik dansitesi 0,100'e ulaştığında içinde 3,5 ml DST Broth bulunan başka bir

Üretim tüpüne tekrar 0,1 ml ilave edildi. İkinci defa 0.100 optik dansiteye ulaşan kültürden, tüplerdeki son konsantrasyon 1×10^5 kob/ml. olacak şekilde üretim tüplerine inokulum yapıldı. Tüm deneylerde başlangış konsantrasyonu 1×10^5 kob/ml olarak seçildi.

B-6 reme Eğrisinin Çizimi ve Standardizasyonu :

Daha önce açıklanan şekilde hazırlanan s cinsinden üreme dönemindeki bakterilerin oluşturduğu E.coli kültüründen 1×10^5 kob/ml. sıvı besiyeri içeren üretim tüpüne ekim yapılıp standard koşullarda hava gönderilerek üretim başlatıldı. Tpdeki bakteri sayısı spektrofotometrenin okuma sınırına ulaştığında onbeş dakika aralıklarla optik dansite okundu. Belirli optik dansite değerlerinde üretim tüpünden 0,1 ml. rnek alınıp, serum fizyolojik ile sulandırıldı. Uygun dilüsyonlardan katı besiyeri içeren plaklara ekim yapıldı. Plakların 37 °C'de 16 saat inkübasyonundan sonra koloniler sayıldı. Koloni sayım sonuçları dilüsyon faktörü ile çarılılarak, örneğin alındığı anda, kültürün mililitresinde bulunan koloni oluşturan bakteri sayısı saptandı. Yarı logaritmik grafik kağıdının apsisine optik dansite okuma ve bakteri ekim zamanı (dakika), sol ordinata örneğin alındığı anda kültürün mililitresinde bulunan koloni oluşturan bakteri sayısı işaretlendi. Sağ ordinata da mililitredeki koloni oluşturan bakteri sayısına karşılık gelen optik dansite değerleri kondu. Bu şekilde zamana bağımlı olarak optik dansite artışına karşılık gelen koloni oluşturan bakteri sayısını gösteren üreme eğrisi çizildi. Bu işlemler Nütrient Broth ve DST Broth'da en az iki kez tekrarlandı.

B-7 Deney Setinin Hazırlanışı :

Herbirinde 3,5 ml. DST Broth bulunan ve 1'den 9'a kadar numaralanmış dokuz adet üretim tüpü hazırlandı. Her tüp tabloda gösterilen özellikleri kapsayacak şekilde düzenlendi (Tablo IV). Antibiyotiklerin seyreltilmesi steril bidistile su içerisinde ikişer katlı azalan konsantrasyonlar şeklinde yapıldı. Her sulandırımından 0,1 ml. üretim tüplerine ilave edilerek Tablo V'de gösterilen antibiyotik konsantrasyonları elde edildi.

Tüp Sıra No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Tüplerin Özellikleri	DST Broth +	DST Broth +	DST Broth +	DST Broth +						
	Hava	Hava	Hava	Hava						
		+	+	+						
		Bakteri	Antibiyotik 8 no.lu tüp	Antibiyotik +						
				Bakteri						

Tablo-IV: Üretim tüplerinin düzeni ve içerikleri.

Antibiyotik konsantrasyonu tüp no. ve semboller	4	5	6	7	8	9
	Δ	▲	○	●	□	■
Ampisillin trihidrat	3.12	6.25	12.5	25	50	100
Cefoperazone sodyum	3.12	6.25	12.5	25	50	100
Oxytetrasiilin	7.85	15.75	31.25	62.5	125	250
Gentamisin Sülfat	3.31	6.62	13.25	26.5	53	106

Tablo V: Çalışılan Antibiyotikler, konsantrasyonları (ug/ml) buldukları tüp numaraları ve grafiklerdeki sembolleri.

B-8 Antibiyotikli Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrilerinin Çizimi

İnokulasyon önceden anlatılan şekilde üretim için hazırlanan bakteri kültüründen 0,4 ml. alınarak tüplerdeki son bakteri konsantrasyonunun 1×10^5 kob/ml. olması sağlandı. Antibiyotik ve bakteri içermeyen tüplere de antibiyotigin ve bakterinin sulandırıldığı solusyonlardan uygun miktarda ilave edilerek tüplerin hacmi 4 ml. ye tamamlandı. Tüplere bakteri ilavesiyle deney başlatıldı. Optik dansitenin okunabildiği an sıfır (başlangıç) kabul edildi. Tüm tüplerin optik dansiteleri belirli zaman aralıklarında aynı anda okundu. Vasat ve bakteri içeren tüplerde 0.500 optik dansite okununcaya kadar üretime devam edildi. Optik dansite vermeyen tüpler bir gece 37°C 'de inkübe edildi. Sonra bir kere daha her tübün optik dansitesi okundu. Yarı logaritmik grafik kağıdının apsisine okuma zamanı, ordinatına optik dansite değerleri

işaretlenerek antibiyotikli ortamdaki üreme eğrileri çizildi. Farklı antibiyotik konsantrasyonlarında çizilen üreme eğrilerinde, çalışılan her antibiyotik konsantrasyonu farklı sembollerle gösterildi. Bu yüzden deney süresince hep aynı optik dansite okunmuşsa, okunan değerler grafikde tek düz çizgi şeklinde (—) belirtildi. Tüplerde farklı optik dansite okunmaya başladığı veya okumanın bittiği noktada semboller grafikte gösterildi. Spektrofotometre 1×10^7 kob/ml. aşağısındaki optik dansiteleri okuyamadığı için grafiklerde 1×10^7 kob/ml ve daha yukarısındaki bakteri sayılarının optik dansiteleri gösterildi. Optik dansitedeki artış bakteri üremesinin göstergesi olarak değerlendirildi.

B-9 Bakteri Üretim Sisteminin Kontrolü :

Tüm deney boyunca yapılan ara kontrollerde vasat ve bakteri içeren 2 no.lu tüpden yapılan bakteri sayım sonuçları bu çalışma için standardize edilen üreme eğrisiyle uygunluk gösterdi. Sterilite kontrolü için her deney sonunda 1 no.lu tüpden ekim yapıldı. Uygun inkübasyon sonunda yapılan kontrollerde hiç üreme gözlenmedi. Her deney iki kere tekrarlandı. Bakterilerin temininden itibaren tüm deney boyunca steril malzeme ile steril şartlarda çalışıldı.

C-

B U L G U L A R

Çalışma öncesinde dirençli suşların saklandıkları süre içinde dirençliliklerini kaybetmedikleri gözlemlendi.

C-1 Bakteri Sayısının Saptanmasında Kullanılan Dalga Boyu

Spektrofotometre ile sıvı besiyerinde üreyen bakterilerden ortaya çıkan bulanıklığı ölçmek için uygun dalga boyu 495 nm olarak saptandı (Tablo VI).

Dalga Boyu	Distile Suya Karşı Vasat	Vasata Karşı (DST Broth) Bakteri 3×10^7 kob/mi
400 nanometre	0.471	0.060
430 "	0.241	0.048
440 "	0.199	0.041
450 "	0.168	0.040
460 "	0.146	0.036
470 "	0.123	0.034
480 "	0.105	0.031
490 "	0.088	0.029
495 "	0.080	0.030
500 "	0.075	0.028
510 "	0.062	0.028
520 "	0.060	0.028
530 "	0.044	0.021
540 "	0.039	0.020
550 "	0.033	0.023
575 "	0.021	0.018
600 "	0.015	0.018
625 "	0.009	0.013

Tablo-VI: Suya karşı DST Broth'un ve DST Broth'a karşı bakteri kültürünün Spektrofotometrenin değişik dalga boylarında verdiği optik dansite değerleri.

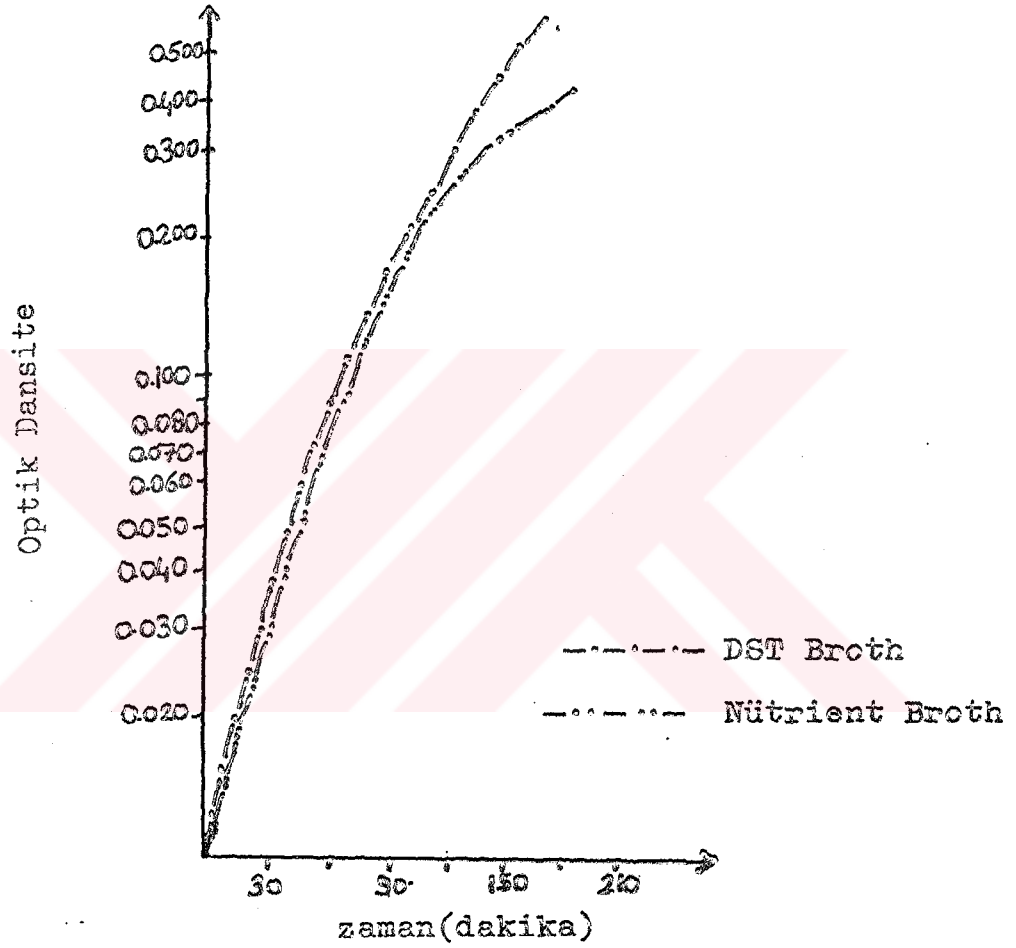
G-2. Bakteri Üretim Sistemine Ait Bulgular :

E.coli suşlarının doubling zamanının 22±2 dakikada kalmasını sağlayacak hava kabarcığı sayısı 60±2 dakika olarak bulundu.

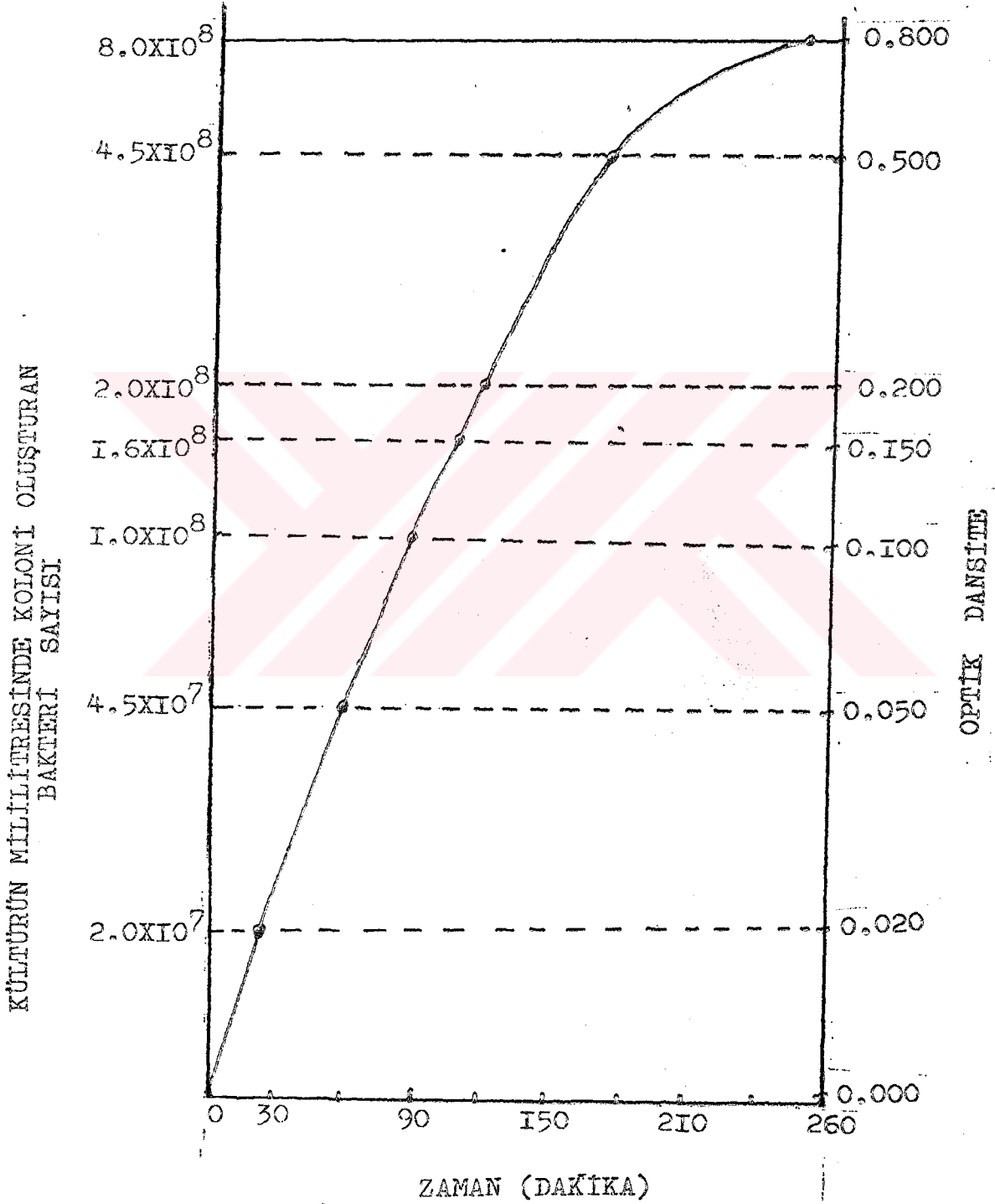
Aynı koşullarda DST Broth ve Nutrient Broth'da üretilen E. coli suşunun her iki ortamdaki üreme eğrileri karşılaştırıldığında önemli farklılık gözlenmedi (Şekil-10). Agar katılan DST Broth ve orjinal DST agar içeren plakların antibiyogram sonuçlarında aynı bakteri ve antibiyotik diskleri için aynı inhibisyon zonu çapları gözlemlendi. Bu bulgular, santrifügasyonla agar çöktürülerek hazırlanan DST Broth'un bu çalışma için kullanılabilceğini gösterdi. Üreme eğrisinin standardizasyonu işleminde elde edilen bulgular yarı logaritmik grafik kağıdına işaretlendi. Çalışmanın kendi sınırları içerisinde doğruluğu kanıtlanan ve optik dansite artışına karşılık gelen mililitredeki koloni oluşturan bakteri sayısını (kob/ml) gösteren standart üreme eğrisi çizildi (Şekil-11).

G-3. Antibiyotikli Sıvı Besiyerinde E.coli Suşlarının Üreme Eğrileri :

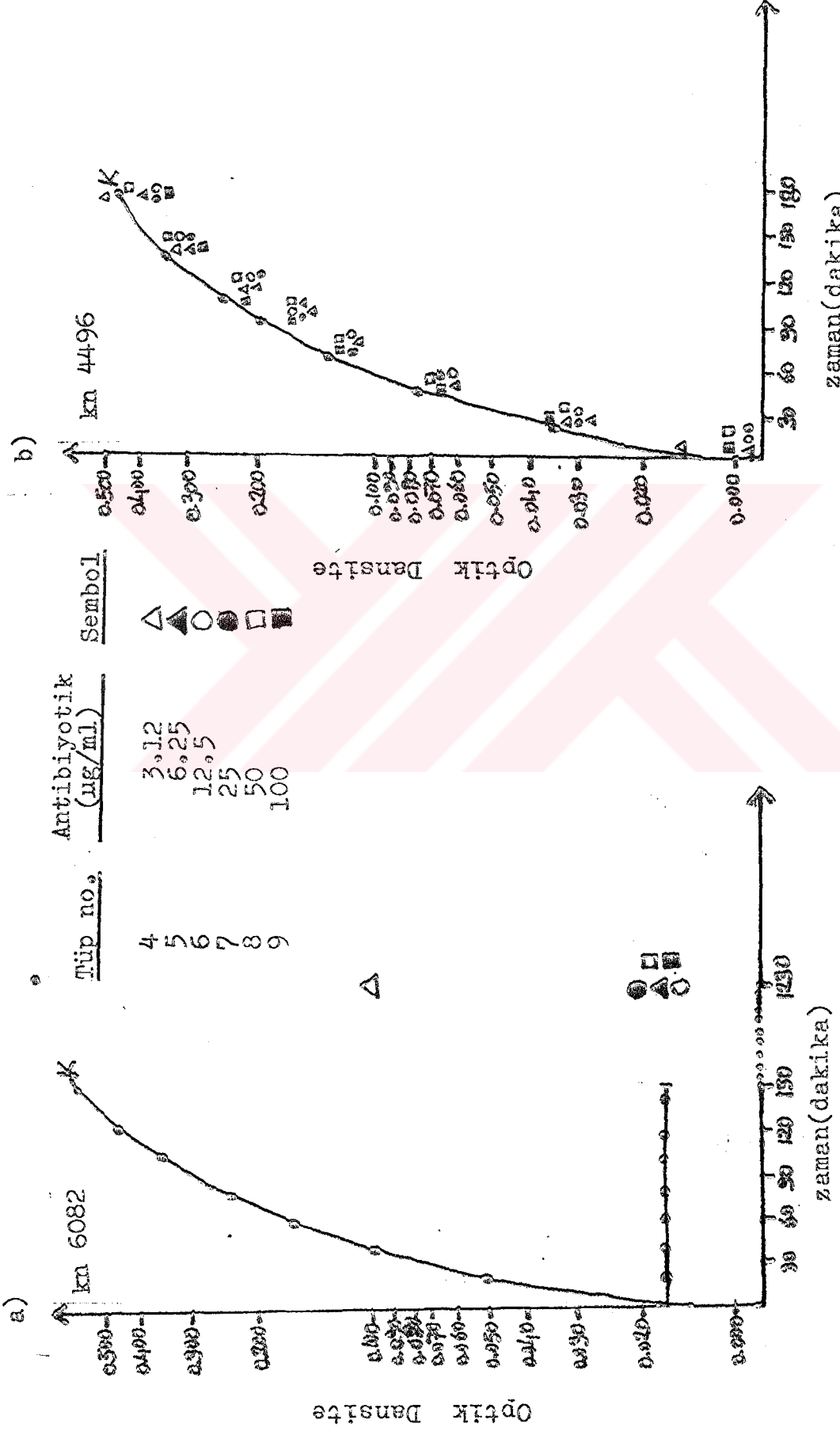
E.coli suşu (klinik no ~~kn~~ 6082) ampisillinin denenen konsantrasyonlarını içeren üretim tüplerinde deney süresince optik dansite vermedi 1200. dakikada (20 saat) yapılan ölçümde 4 no.lu tüpte 0.100 optik dansite (O.D.) okunurken diğer tüpler optik dansite vermedi (Şekil 12-a). E.coli (kn 4496) ise ortamdaki antibiyotikten etkilenmeden üredi. Antibiyotiksiz ortamdaki üreme eğrisine benzer üreme eğrileri elde edildi (Şekil 12-b).



Şekil-10: Aynı E.coli suşunun DST Broth ile Nutrient Broth'daki üreme eğrileri (37 °C'de 60 2/dk. hava kabarcığı gönderilen koşullarda).



Şekil-11: E.coli'nin, standardize edilen üreme eğrisi. (37 °C'de dk.da 60 ± 2 hava kabarcığı gönderilen DST Broth'da yapılan üretim)

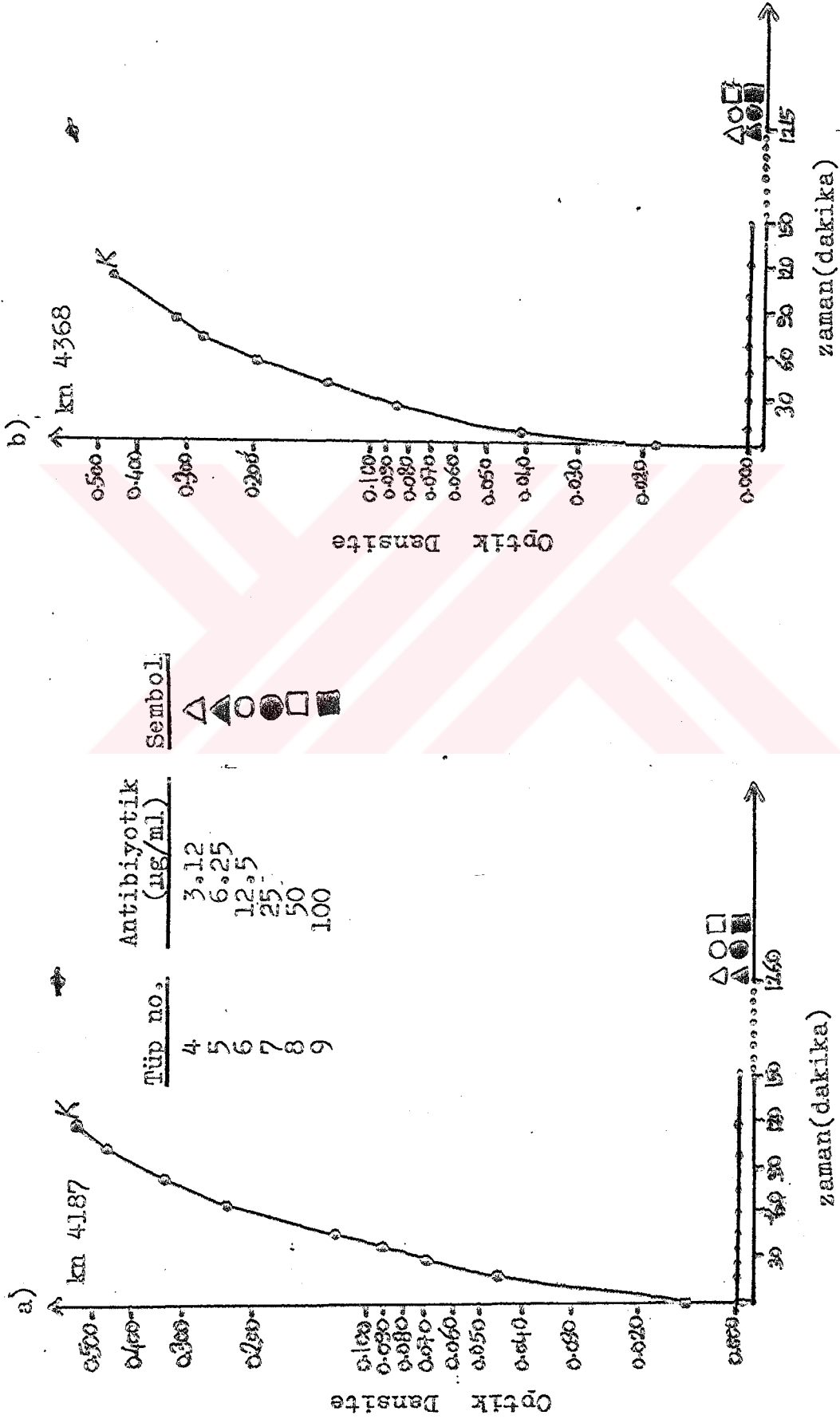


Şekil-12 a, b: E.coli'lerin (kn 6082; 4496) ampisillinsiz ve ampisillinin değişik konsantrasyonlarını içeren DST Broth'daki üreme eğrileri. (37 °C'de 60±2/dk. hava kabarcığı gönderilen koşullarda).

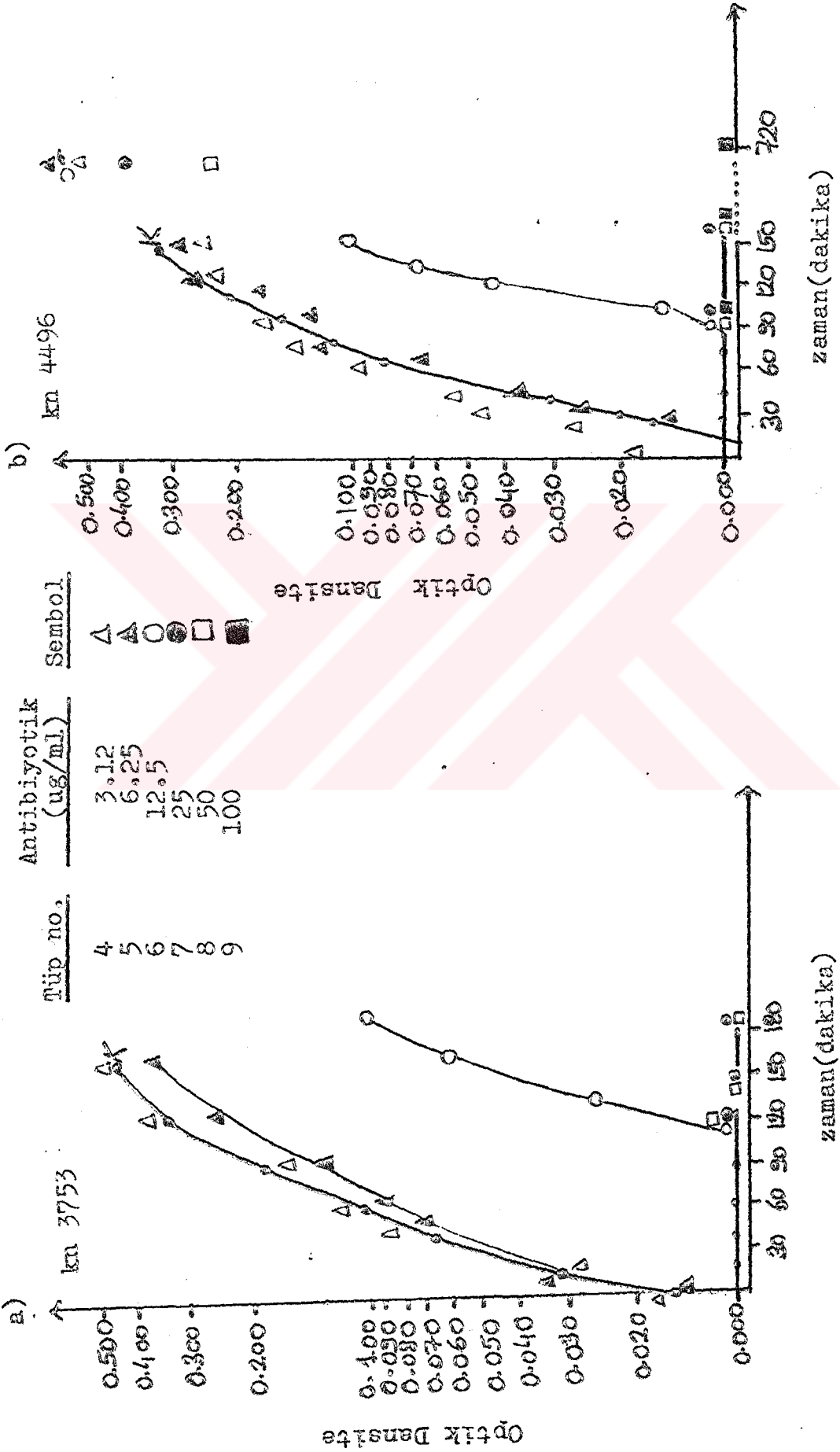
E.coli suşunun (kn 4496) dirençliliği ampisillinin denenilen konsantrasyonlarında, antibiyotik konsantrasyonuna bağımlı değildi.

E.coli suşları (kn 4187; 4368) cefoperazonun denenilen konsantrasyonlarını içeren tüplerde deney boyunca üremedi. 1260 ncı dakikada (21 saat) yapılan ölçümde tüplerde yine üreme gözlenmedi (Şekil 13 a-b). E.coli suşları (kn 3753; 4496) 4 ve 5 no.lu tüplerde antibiyotiksiz ortamdaki üreme eğrilerine yaklaşan ve çakışan üreme eğrileri verirken 6 no.lu tüp 120. dk (2 saat)ya kadar optik dansite vermedi. 140. dk. ve daha sonraki ölçümlerde optik dansite okundu. 6 no.lu tübün üreme eğrisi 4 ve 5 no.lu tüplerinkine nazaran sağa kayma yaptı (Şekil 14 a-b). 7, 8, 9 no.lu tüplerde deney süresince üreme gözlenmedi. 780 ncı dakikada (13 saat) yapılan ölçümde E.coli'nin (kn. 4496) 4, 5, 6, 7 no.lu tüplerinde 0.300'ün üstünde optik dansite okundu. 8 no.lu tüpte 0.250 O.D. okunurken 9 no.lu tüpte 0.000 O.D. okundu (Şekil 14-b). E.coli suşu (kn. 4079) üretim esnasında antibiyotikli tüplerde üreme göstermedi. 900 ncü dakikada (15 saat) yapılan ölçümde 5 no.lu tüpte 0.450 O.D., 6, 7, 8 no.lu tüplerde 0.030 - 0.040 O.D. 9 no.lu tüpte 0.000 optik dansite okundu (Şekil 15).

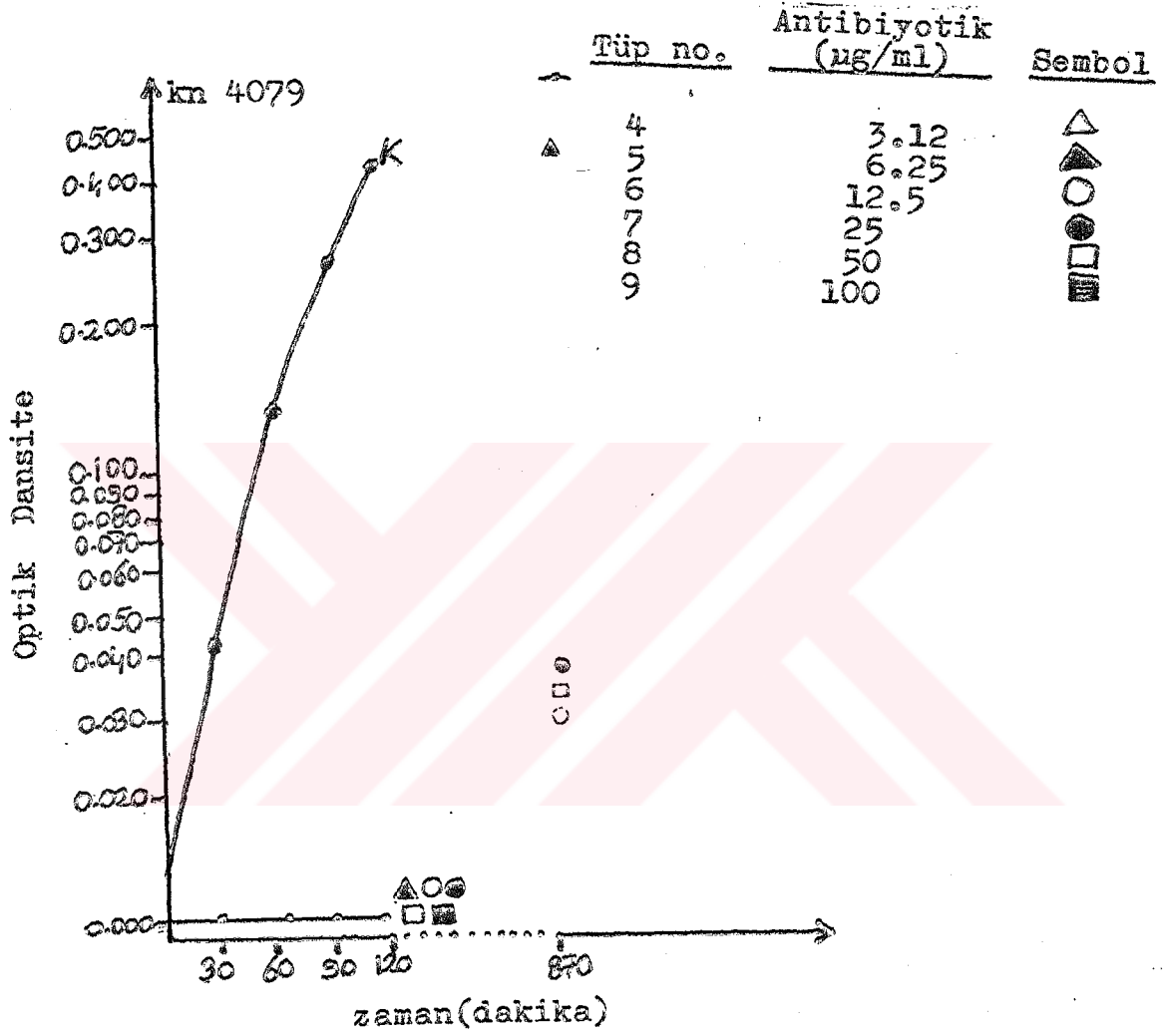
E.coli suşu (kn. 4079) oxytetrasiklinin 3.75-62.5 ug/ml arasındaki konsantrasyonlarını içeren 4, 5, 6, 7, 8 no.lu tüplerde antibiyotikden etkilenmeden üredi. Antibiyotiksiz ortamdaki üreme eğrisiyle çakışan üreme eğrileri elde edildi.



Şekil-13 a,b: E.coli'lerin (ka 4187; 4368) cefoperazonsuz ve cefoperazonun değişik konsantrasyonlarını içeren DST Broth'daki üreme eğrileri (37 °C'de 60 ± 2/dk. hava kabarcığı gönderilen koşullarda).

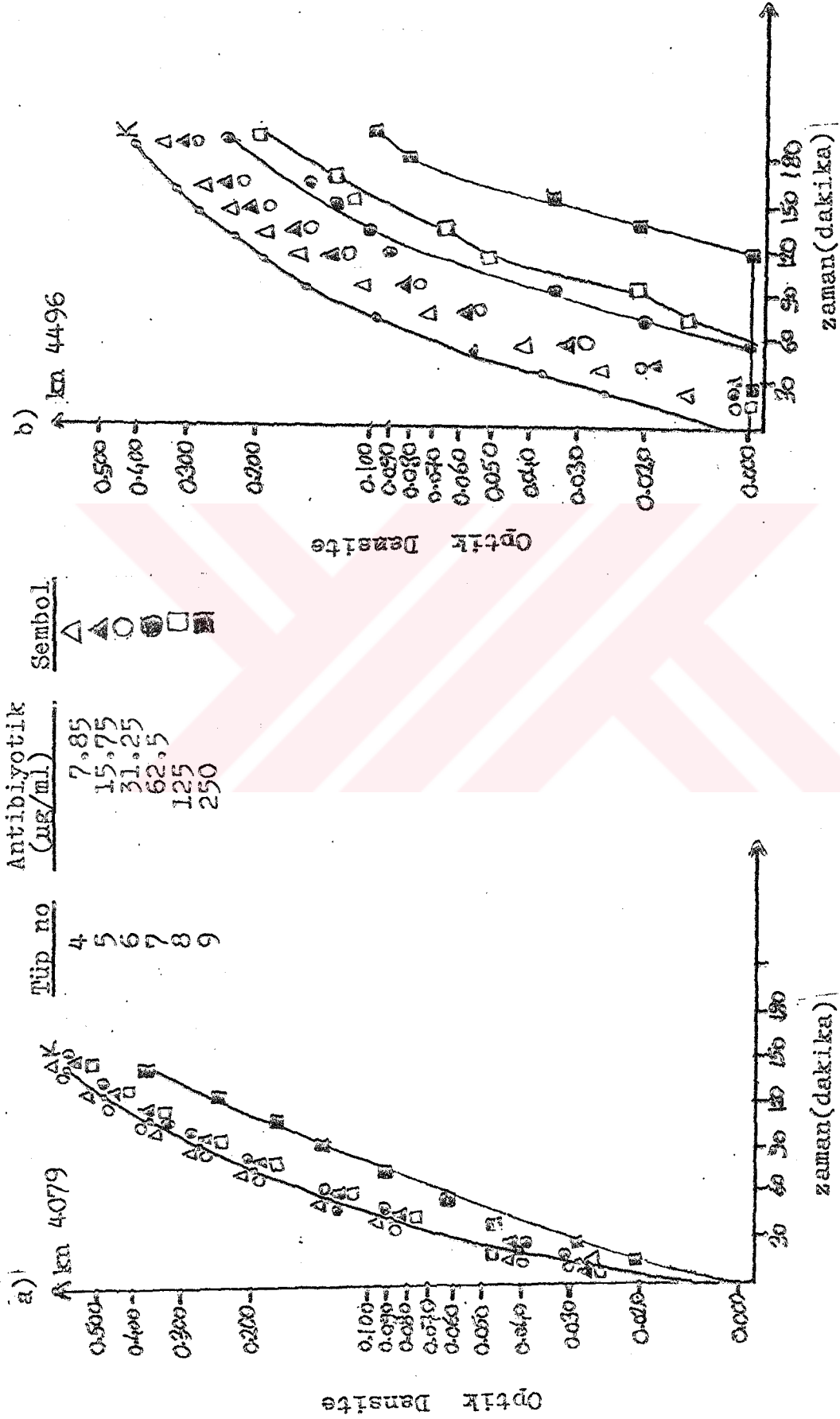


Şekil-14 a,b; E.coli'lerin (kn 3753; 4496) cefoperazonsuz ve cefoperazonun değişik konsantrasyonlarını içeren DST Broth'daki üreme eğrileri, (37 °C'de 60±2/dk, hava kabarcığı gönderilen koşullarda).

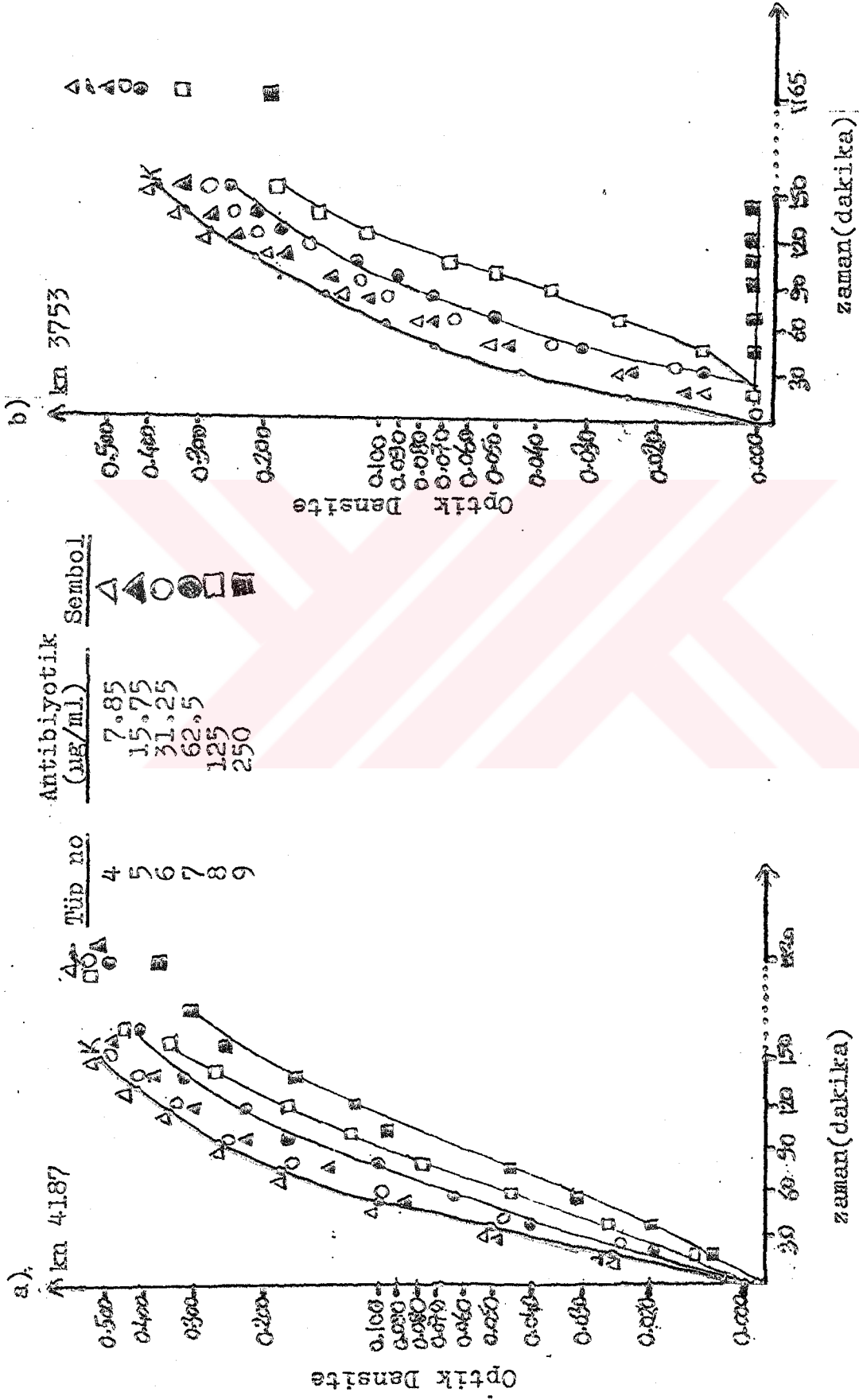


Şekil-15: E.coli'nin (kn 4079) cefoperazonsuz ve cefoperazonun değişik konsantrasyonlarını içeren DST Broth'daki üreme eğrisi. (37 °C'de 60İ 2/dk. hava kabarcığı gönderilen koşullarda.)

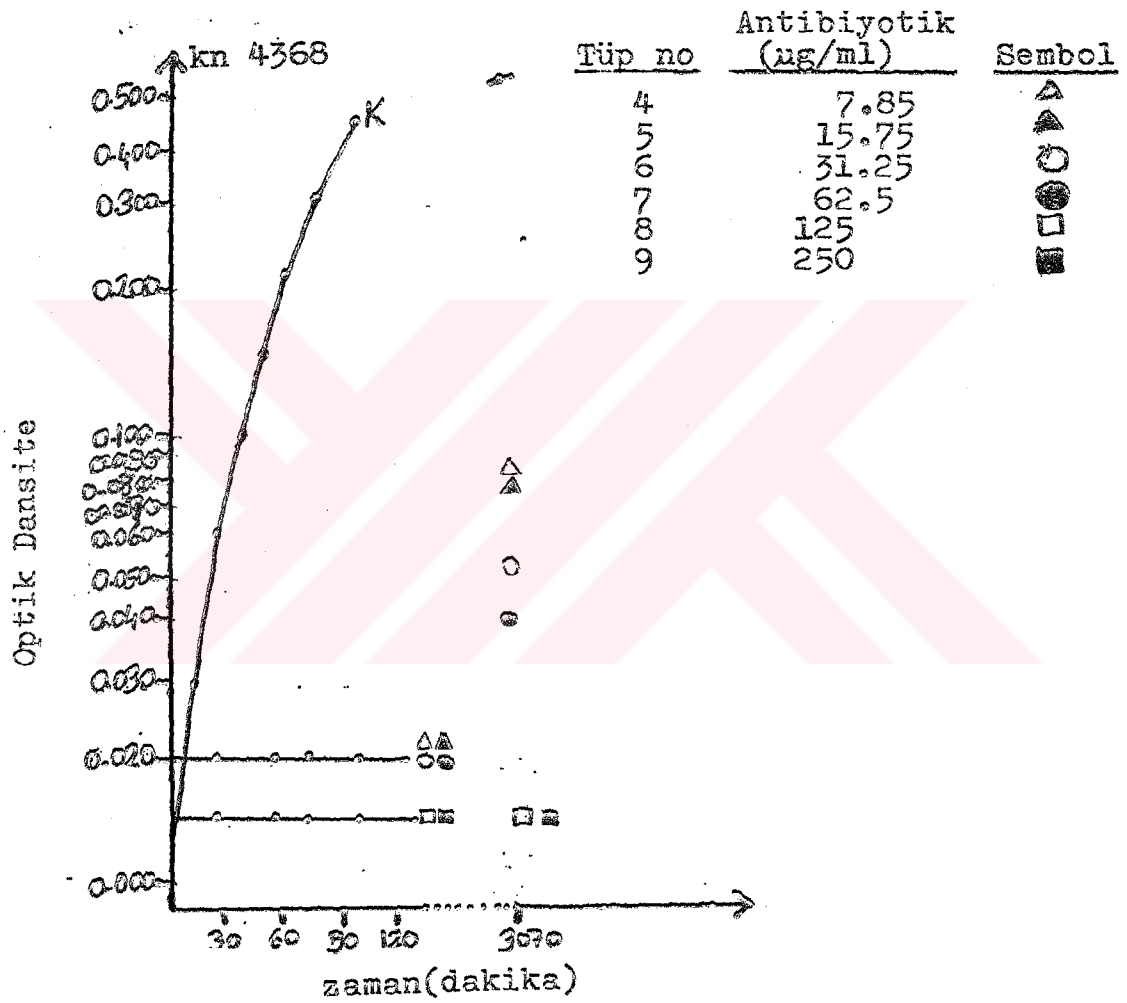
9 no.lu tüpteki E.coli'nin üreme eğrisinde sağa kayma göz-
lendi (Şekil 16-a). E.coli suşunun (kn 4496) antibiyotikli
tüplerdeki üreme eğrilerinde, antibiyotik konsantrasyonu
arttıkça sağa doğru kayma gözlendi (Şekil 16-b). E.coli
suşu (kn 4187) antibiyotikli tüplerde, antibiyotiksiz tübün
üreme eğrisine yaklaşan üreme eğrileri verdi (Şekil 17-a).
E.coli suşu (kn 3753) 4, 5, 6, 7, 8 no.lu tüplerde deney
süresince üreme gösterirken 9 no.lu tüpte üreme göstermedi.
1140 ncı dakikada (19 saat) yapılan ölçümde 9 no.lu tüpde
0.200 O.D. okundu (Şekil 17-b). E.coli suşu (kn 4368) deney
süresince 4, 5, 6, 7 no.lu tüplerde 0.020,8 ve 9 no.lu tüp-
lerde 0.010 O.D. verdi. 3000 ncı dakikada (50 saat) yapılan
ölçümde 4 no.lu tüpte 0.084 O.D., 5 no.lu tüpte 0.070 O.D.
6 no.lu tüpte 0.050 7 no.lu tüpte 0.040 O.D. okunurken 8 ve
9 no.lu tüplerde yine 0.010 optik dansite okundu (Şekil 18).
E.coli suşları (kn 4079; 4187; 4368) gentamisin denenen
konsantrasyonlarında deney süresince üreme göstermediler
(Şekil 19 a-b; 21). E.coli suşu (kn 3753) 4, 5, 6 no.lu tüp-
lerde birbirine yaklaşan üreme eğrileri verdi. 7 ve 8 no.lu
tüplerde üreyen E.coli'nin üreme eğrileri antibiyotik kon-
santrasyonuna bağımlı olarak sağa kaydılar (Şekil 20-a). E.coli
suşu (kn 4496) 4, 5, 6, 7 no.lu tüplerde antibiyotik konsant-
rasyonlarından etkilenmeden ürediler. 8 no.lu tüpte sağa kayan
üreme eğrisi elde edildi. 9 no.lu tüp de üreme gözlenmedi.
1140 ncı dakikada (19 saat) yapılan ölçümde 9 no.lu tüp de
0.350 O.D. okundu (Şekil 20-b).



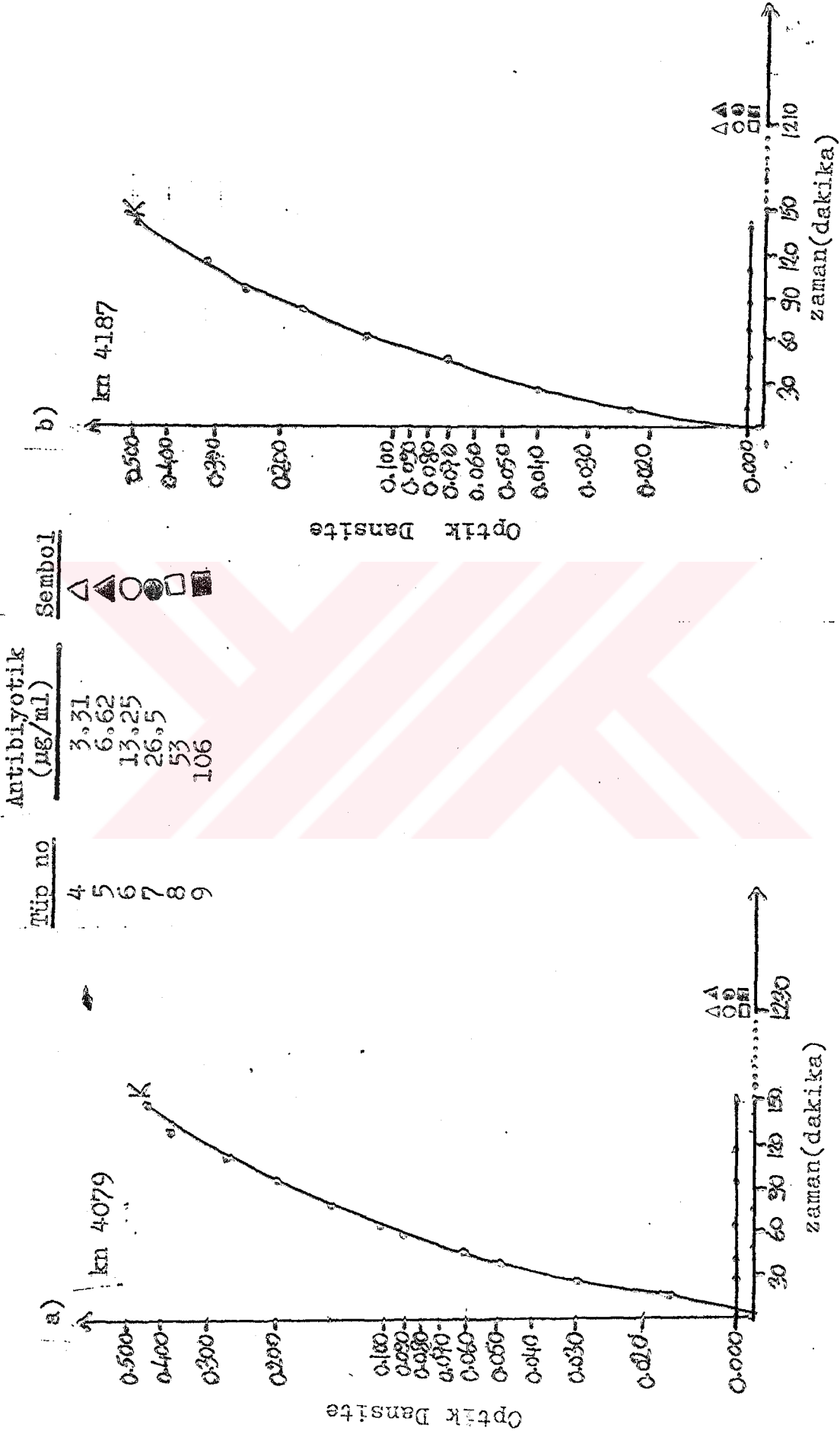
Şekil-16 a,b: E.coli'lerin (kn 4079; 4496) Oxytetrasiklinisiz ve Oxytetrasiklinin değişik konsantrasyonlarını içeren DST Broth'daki üreme eğrileri (37°C'de 60±2/dk. hava kabarcığı gönderilen koşullarda)



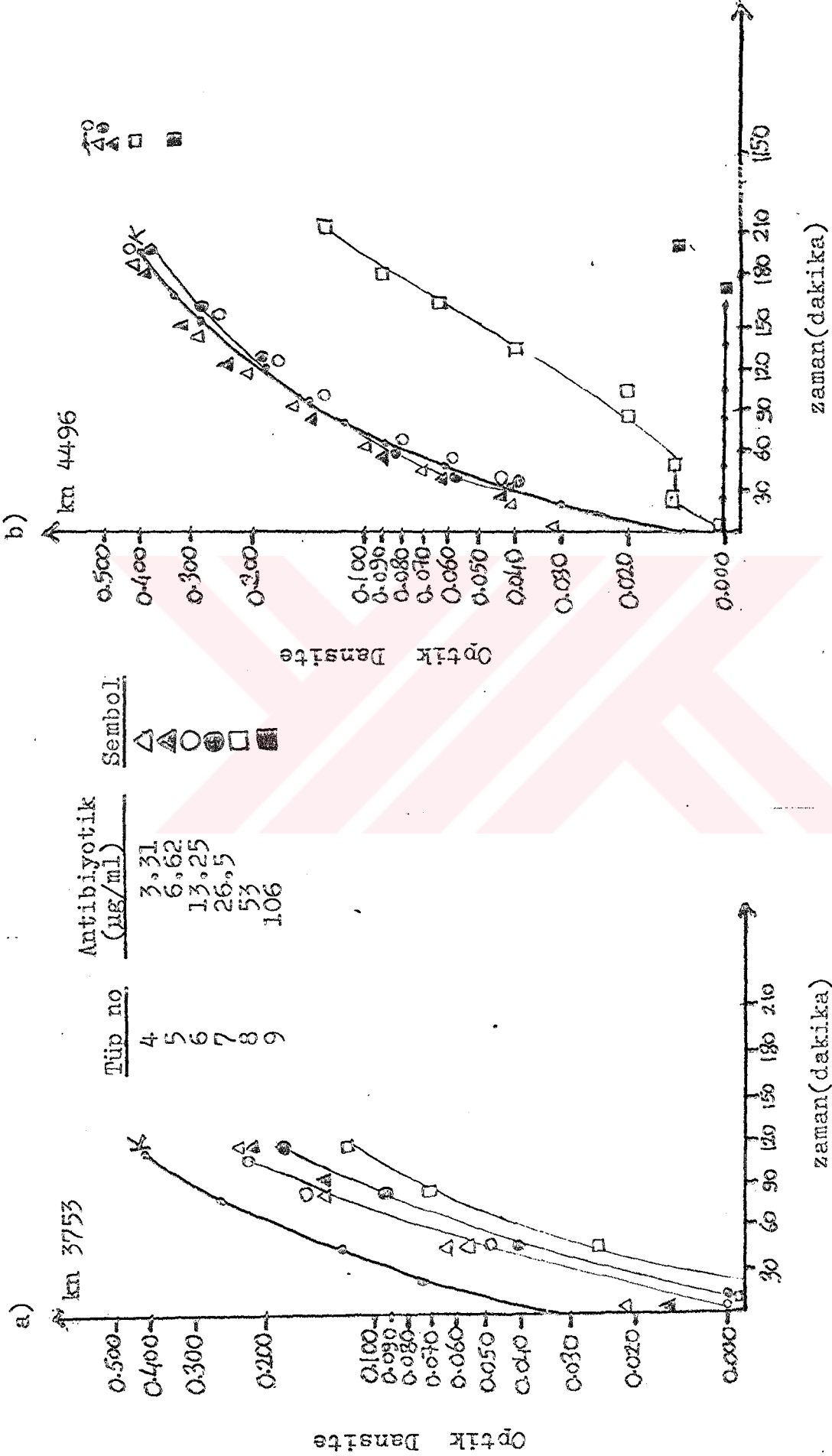
Şekil-17 a,b: E.coli'lerin (kn 4187; 3753) oxytetrasiklin ve oxytetrasiklinin değişik konsantrasyonlarını içeren DST Broth'daki üreme eğrileri. (37 °C'de 60±2/dk. hava kabarcığı gönderilen koşullarda)



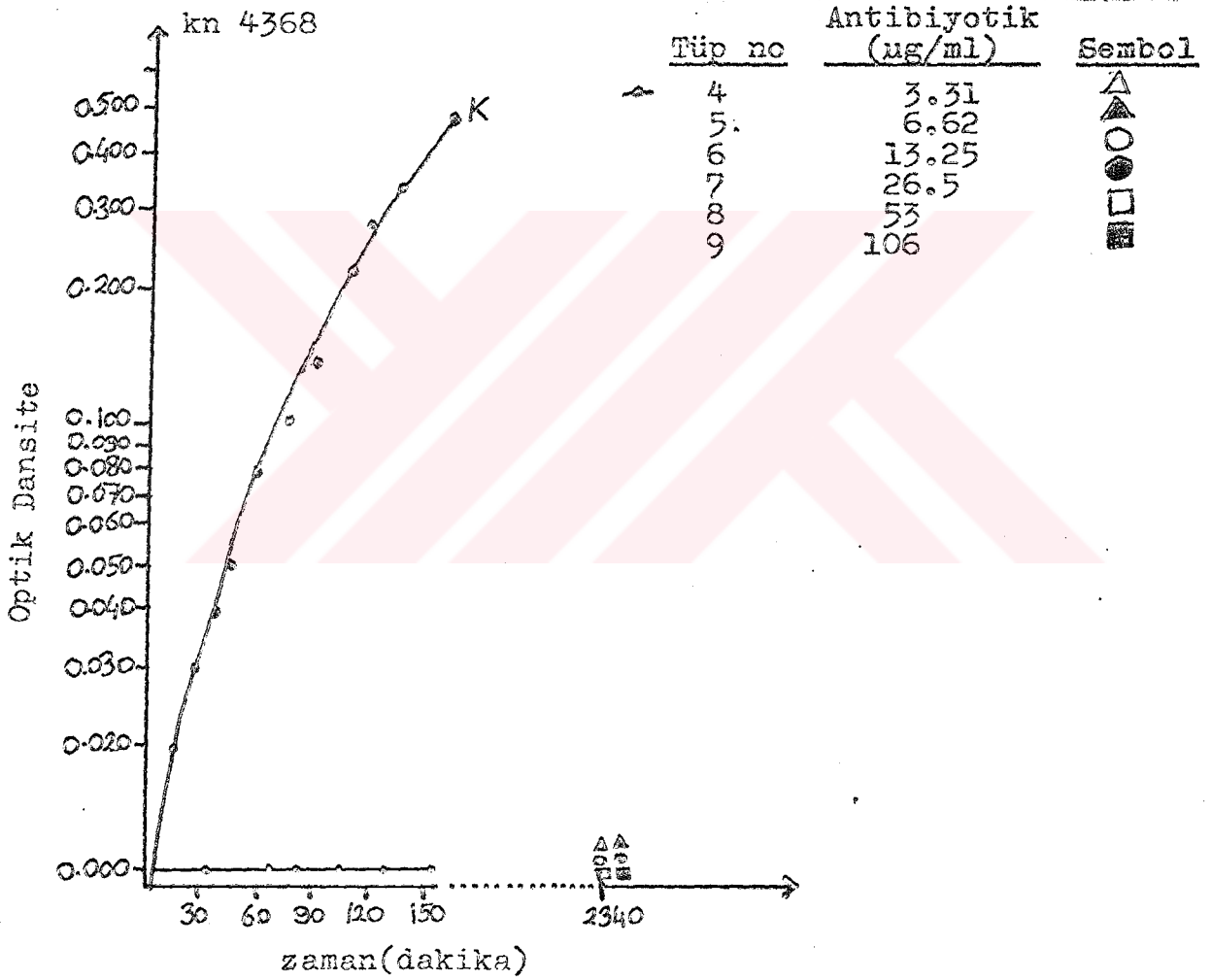
Şekil-18: E.coli'nin (kn4368) oxytetrasiklinsiz ve oxytetrasiklinin değişik konsantrasyonlarını içeren DST Broth'daki üreme eğrisi. (37 °C'de 60 ± 2/dk. hava kabarcığı gönderilen koşullarda)



Şekil-19 a,b: E.coli'lerin (kn 4079; 4187) gentamisiniz ve gentamisinin değişik konsantrasyonlarını içeren DST Broth'daki üreme eğrileri. (37 °C'de 60±2/dk. hava kabarcığı gönderilen koşullarda)



Şekil.- 20 a,b : E.coli susularının (km 3753; 4496) gentamisiniz ve gentamisinin değişik konsantrasyonlarını içeren DST Broth'daki üreme eğrileri.(37 °C'de 60±2/dk, hava kabarcığı gönderdiği koşullarda)



Şekil-21: E.coli suşunun (kn 4368) gentamisinsiz ve gentamisinin değişik konsantrasyonlarını içeren DST Broth'daki üreme eğrisi. (37 °C'de 60±2/dk hava kabarcığı gönderilen koşullarda)

D- T A R T I Ő M A V E S O N U Ğ

Araştırmada kullanılan E.coli suşlarından antibiyotiklere direnç gösterenlerin direnç kayıplarını önlemek için dirençli olduğu antibiyotiği içeren DST agarda stoğa alınarak literatüre uyuldu (15; 30).

E.coli suşlarının antibiyotiklere hassasiyeti Dünya Sağlık Teşkilatı'nın uygun górdüđu ve gentamisinin analogu olabilecek maddeleri içermeyen DST Agar'dan hazırlanan DST Broth'da yapılarak bu konudaki yayınlara uygunluk sağlandı. Gereç ve yöntemde açıklanan şekilde DST agar'dan hazırlanan DST Broth'un kontrol bulguları, besiyerinden agarın uzaklaştırılması işleminin antibiyotik disklerinin katı besiyerinde oluşturdukları inhibisyon zonu çapları açısından besiyerinin özelliğini bozmadığını gösterdi. DST Broth'un bulunmadığı zamanlarda DST agardan -agar uzaklaştırılarak DST Broth hazırlanıp bakteri üretiminde ve antibiyotik hassasiyeti ölçmede kullanılabileceği doğrulandı.

Bakterilerin üreme eğrileri ve koloni oluşturan sayıları üzerine antimikrobiyal maddelerin etkilerinin saptanması; bakterilerin antimikrobiyal maddelere maruz bırakılmasından itibaren belirli zaman aralıklarında mümkün olduğu kadar aynı anda her tüpden, antimikrobiyal maddeyi uzaklaştırıp uygun dilüsyondan ekim yapmayı gerektirir.

Labratuvar imkanlarının kısıtlı olması ve bu tip çalışmalarda Türbidometrik yöntemin kullanılabilmesinden dolayı araştırmada Türbidometrik yöntem (Bulanıklık ölçümü) kullanıldı (6; 15; 19; 28; 29; 30). Bulanıklık ölçümünde kullanılan spektrofotometre 1×10^7 kob/ml aşağısındaki bakteri sayısını okuyamadığından çalışma spektrofotometrenin bulanıklığı okuyabilme sınırları içerisinde üs cinsinden üreme döneminde yapıldı.

Bakteri kültürlerinin optik dansiteleri suya karşı vasatın düşük, vasata karşı bakteri kültürünün yüksek optik dansite verdiği ve bakteri üremesinden ortaya çıkan bulanıklığın ölçüldüğü 495 nm. dalga boyunda okundu. Bu şekilde su, vasat ve benzeri maddelerin vereceği optik dansite en aza indirgendi (28; 30).

Kullanılan spektrofotometreye uygun üretim tüpleri arasından aynı optik dansiteyi veren tüpler seçilerek deney seti içindeki tüplerin birlikte okunmaları gerçekleştirildi. Deney süresince üretim tüplerinden sürekli ekim yapmayı önleyen standart üreme eğrisi çizimi ve üretimde kullanılan tüplerle optik dansitenin de okunabilmesi zaman ve maliyet tasarrufu sağladı.

Oksijen hariç optimum koşullarda üretilen aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin doubling zamanlarını kısaltıp belirli sınırlar içerisinde sabit tutabilmek; ortamdaki besin maddelerinin ve bakterilerin homojen dağılımını sağlamak amaçlarıyla üretim ortamları havalandırılır.

Labratuvarlarda havalandırma için genellikle çalkalamalı su banyosu veya sallayıcısı bulunan etüv kullanılırken bu imkanın olmadığı labratuvarımızda akvaryum motoru ve hava dağıtıcı sistemi kullanıldı. Bu şekilde E.coli suşlarının doubling zamanı literatüre uygun olarak 22 ± 2 dakikada tutuldu. Hem de ortamın besin ve bakteri dağılımı yönünden homojenizasyonu sağlandı. Küçük inokulumla başlamanın dezavantajı en aza indirildi. Ingledew ve Robert (1984) E.coli'nin patojenik suşlarının ince barsak epiteline tutunduklarında epitel hücrelerindeki oksijeni kullanarak diğer bakterilere karşı ekolojik avantajlar sağlayabildiklerini belirtirler. Üretim tüplerine 60 ± 2 /dk. hava kabarcığı gönderilerek patojenik suşların invivodaki koşullarına oksijenden yararlanabilme açısından benzer bir ortam oluşturulduğu da söylenebilir. Üretim ortamında % 10 karbondioksit bulunması tetrasiklinlerin ve aminoglycosidlerin aktivitesini primer olarak etkiler. Tübün dip kısmına cam borular, 4-5 mm boşluk kalacak şekilde yerleştirildiğinden üretim ortamının tamamının havalanması sağlandı. Karbondioksitin olumsuz etkileri önlendi(19).

Deney sonuçlarının doğru olabilmesi için deney setindeki tüpler kendi içlerinde kontrol grublarını içerecek şekilde düzenlendi. Bunun için 1 no.lu tüp 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 no.lu tüplerin sterilite kontrol tüpü olarak fonksiyon gördü. Aynı zamanda 2 no.lu tübün sıfır ayarı olarak kullanıldı. 2 no.lu tüp 4, 5, 6, 7, 8, 9 no.lu tüplerin kontrolü olarak seçildi. E.coli suşlarının üreme eğrileri üzerine antibiyotik konsantrasyonlarının etkisini

çalışırken de 3 no.lu tüp hem antibiyotikden ileri gelen optik dansiteyi okumada hem de 4, 5, 6, 7, 8, 9 no.lu tüplerin sıfır ayarı olarak kullanıldı. Böylece antibiyotikden kaynaklanan optik dansitenin spektrofotometre tarafından okunması önlendi.

Brown ve Williams (1985) bakterilerde üretim koşullarının değişimine bağlı olarak meydana gelen hücre duvarı özelliğindeki farklılaşmaların kararlı denge dönemine geçmeden birkaç jenerasyon önce başladığını ve bunun bakterilerin antimikrobiyal maddelere hassasiyetini etkileyebileceğini belirtirler. Gecelik kültürden alınan bakteriler iki defa üs cinsinden üreme döneminin ortasına kadar üretildikten sonra üretim tüplerine inokulum yapıldığından, hücre duvarı özelliği açısından homojen ve genç bakterilerle çalışma yapıldı. Antibiyotiklere hassasiyeti etkileyebilecek bu değişimler önlendi.

Inokulum büyüklüğünün standardizasyonu antibiyotik hassasiyeti ölçme yöntemlerinin en önemli noktalarından biridir (16). International Cooperative Study Group (ICS, 1971) raporuna göre bu çalışmalarda inokulum, üs cinsinden üreme dönemindeki ya da kararlı denge döneminin başlangıcındaki kültürlerden yapılmalıdır. Tüp dilüsyon yöntemi ile çalışılıyorsa inokulum büyüklüğü 1×10^5 - 1×10^6 kob/ml arasında olmalıdır (19). E.coli fecesin bir gramında 1×10^5 - 1×10^8 arasında değişen sayılarda bulunur (4). Üriner sistem enfeksiyonlarında milimetreküpde 1×10^5 bakteri sayısı patojenite sınırı olarak kabul edilir (32). Kirby-Bauer disk

yönteminde milimetrekareye düşen bakteri sayısı 1×10^5 ile 1×10^7 arasında değişir. Literatüre ve kliniğe uygun olarak inokulum büyüklüğü tüm deneylerde 1×10^5 kob/ml olarak seçildi.

Optik dansite okuma için tüpler su banyosundan spektrofotometreye 37°C su içinde taşınarak ve her okuma işlemi 3 dk. içinde tamamlanarak bakterilerin ısı değişikliğinden etkilenmesi en aza indirildi.

Deney boyunca yapılan dilüsyon işlemlerinden gelecek hataları önlemek için dilüsyonun her basamağında ayrı pipet kullanıldı. Koloni sayımında plak başına 100-300 koloni içeren plaklar hesaba katıldı. Aynı dilüsyondan en az iki petri plâna ekim yapıp sayımların ortalaması alındı.

Yarı logaritmik grafik kağıdına çizilen üreme eğrilerinde üs cinsinden üreme dönemi düz çizgi şeklinde görüldüğünden bu dönemdeki değişimleri izlemek kolaydır. Düz çizgi elde edilmesinin nedeni geometrik artış gösteren değerlerin logaritmalarının aritmetik dizi vermesidir. Bundan dolayı çalışma üs cinsinden üreme döneminde yapıldı ve bakterilerin üreme eğrileri yarı logaritmik grafik kağıdına çizildi.

Deneyde kullanılan E.coli suşları için standart koşullarda çizilen üreme eğrisi ve ara kontrol bulguları Terzioğlu (1975) tarafından E.coli K-12 Hfr için çizilen üreme eğriyle karşılaştırıldığında bu çalışma için önemli olacak farklılık gözlenmedi.

Kullanılan antibiyotiklerin stok solusyonları hazırlanmadan önce antibiyotiklerin içerdiği katkı maddesinin miktarı hesaplanarak doğru ve etkin konsantrasyonlarda çalışıldı. Antibiyotiklerin ikişer kat azalan konsantrasyonları kullanılarak literatüre uyuldu (6; 15; 18). Oxytetrasiklinin ve Ampisillinin stok solusyonlarının stabilitesi ancak -70°C de korunabilmektedir. Deney sırasında bu imkan bulunmadığı için ampisillin ve oxytetrasiklin deney öncesi taze olarak hazırlandığı anda kullanıldı (30). Gentamisin ve Cefoperazonun stok solusyonları -20°C derin dondurucuda saklanarak aktivite kaybı önlenmiştir (30). Disk-diffüzyon yönteminde olduğu gibi ortamda antibiyotik konsantrasyonu gradienti oluşturma yerine, çalışmada sıvı besiyerine antibiyotik doğrudan katılarak ortamda homojen dağılımı sağlandı.

Spektrofotometre 1×10^7 kob/ml aşağısındaki bakteri sayısını okuyamadığından deney süresince tüplerde optik dansite okunamaması her zaman üreme yok anlamında yorumlanmadı. Antibiyotik hassasiyeti ölçme deneylerinde kesinlikle üremenin olup olmadığı üretim tüplerinden antibiyotik uzaklaştırıp ekim yapmayı gerektiren bir seri ek deneylerle saptanabilir. Çalışma esnasında bu imkan bulunmadığı için spektrofotometrenin bu dezavantajı aşağıdaki şekilde yok edilmeye çalışıldı. Deney bitimini takiben optik dansite okunmayan tüpler bir gece 37°C 'de inkübe edilip birer kere daha optik dansiteleri okundu. Denenen antibiyotik konsantrasyonları inokule edilen 100.000 bakterinin 99.000 öldürülüp 1000 tane canlı üreyebilen bakteri ortamda kalırsa 8-9

saat içinde spektrofotometrenin okuyabileceği bakteri sayısına ulaşılabilir.

Optik dansite artışının gözleendiği tüplerden uygun dilüsyonlarda ekim yapıldı. Bakterilerin plaklarda koloni oluşturduğu gözleendi. Ancak antibiyotik ortamdan uzaklaştırılmadığından sayım sonuçları bulgulara alınmadı.

Cefoperazone, oxytetrasiklin ve Gentamisine hassas E.coli suşları bu antibiyotiklerin bazı konsantrasyonlarında yeniden üreme gösterdi (Şekil 14; 17 b; 18; 20 a). E.coli suşlarına (kn 4187; 4368) cefoperazonun denenen konsantrasyonları bakterisid etki gösterirken, 3.12-12.5 ug/ml arası konsantrasyonları E.coli suşlarına (kn 4496; 3753) bakterisid etki gösteremedi. Bu konsantrasyonlarda üreme gözleendi. E.coli suşlarına (kn 4079; 4187; 4368) gentamisinin denenen konsantrasyonları bakterisid etki gösterirken diğer E.coli suşlarına (kn 4496; 3753) bakterisid etki gösteremedi. 3.35-53 ug/ml konsantrasyonlarında üreme gözleendi. Grafiklerde görüldüğü şekilde E.coli suşlarının bu antibiyotiklere gösterdiği dirençlilik ve antibiyotiğin etki şekli üretim ortamındaki antibiyotik konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilmekteydi.

E.coli suşları (kn 3753; 4496) oxytetrasiklinin denenen konsantrasyonlarında üreme gösterirken üreme eğrisi antibiyotik konsantrasyonu arttıkça sağa doğru kayd. Doğru ve başarılı bir tedavi için tedavi sırasında bu antibiyotik konsantrasyonlarının altına inilmeyecek şekilde antibiyotik

dozunun ve verilif süresinin saptanması gerekmektedir. Yoksa enfeksiyon odağındaki hassas bakteriler dirençli hale dönüşebilirler (33).

Üretim esnasında E.coli'lerin yeniden, üreme gösterdiği antibiyotik konsantrasyonları, antibiyotik kullanımı sırasında veya sonrasında serumda, vücut sıvılarında, enfeksiyon odağında ulaşılan antibiyotik konsantrasyonlarına karşılık geldiği durumlarda, enfeksiyonun devamı, yeniden ortaya çıkışı gözlenebilir. Bu konuda çalışanların bir bölümü enfeksiyon vak'alarında yüksek doz ve aşırı antibiyotik kullanımının tatminkar sonuç almak için genelde tercih edilen yol olduğunu belirtir(29). Bu tarzda antibiyotik kullanımı sonrasında vücutdaki diğer dirençli bakteriler hızlı üreme dönemine girebilirler. Süper enfeksiyon olarak bilinen bu durum önemli klinik sonuçlara yol açabilir. Tedavi ya da koruyucu amaçlarla antibiyotikler kullanılırken dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkışının halk sağlığına olan etkilerinin de dikkate alınması gerektiği bildirilmektedir (22). Bu yüzden, önemli klinik vak'alarda enfeksiyon odağındaki muhtemel bakteri konsantrasyonlarına bağımlı antibiyotik doz tayininin ve verilif süresinin Türbidometrik yöntem veya benzer yöntemlerle yapılması daha uygun olacaktır. Terzioğlu (1972) bu konuda benzer bir çalışma yapıp hastaya verilecek ilaç dozu tayininde bu yöntemin standardize edilip kullanıldığında invivo'ya daha yakın sonuçlar alınabileceğini belirtir.

Farklı antibiyotiklerin E.coli suşlarının üs cinsinden üremelerine etkisi ortamdaki etkin konsantrasyonlarına ve deney süresine bağlı olarak değişti. Deney koşullarının standardize edildiği bu tip çalışmalar yeterli zaman içerisinde yapıldığında, en az hata taşıyan, tekrarlanabilir sonuçların elde edilebileceği gözlemlendi. Sonuç olarak, sıvı besiyerinde yapılan deneylerde optimum antibiyotik konsantrasyonu saptanırken; standart koşullarda, yeterli zaman aralığında çalışılması gerektiği kanısına varıldı.



Ö Z E T

Farklı grublardan antibiyotiklerin, klinikden izole edilen 5 *Escherichia coli* suşunun üs cinsinden üremesine etkileri araştırıldı. Farklı grublardan antibiyotik olarak Penisillinlerden Ampisillin, üçüncü kuşak Cephalosporinlerden Cefoperazon, Tetrasiklinlerden Oxytetrasiklin, Aminoglycosidlerden Gentamisin seçildi. Havalandırılan DST Broth'da optimum üretim koşulları saptanarak standardize edildi. En uygun dalga boyu olarak bulunan 495 nm.'de, kültürlerin zamana karşı optik dansite değerleri ve mililitredeki koloni oluşturan bakteri sayıları saptandı. Bu değerler yarı logaritmik kağıda yerleştirilerek standart üreme eğrileri elde edildi. Üretim süresi ve koşullarına bağlı olarak her antibiyotiğin farklı konsantrasyonlarının etkisi zamana karşı optik dansite okunarak araştırıldı.

Farklı antibiyotiklerin, *E.coli*'lerin üs cinsinden üremelerine etkisi, ortamdaki etkin konsantrasyonlarına ve deney süresine bağlı olarak değişti. Deney koşullarının standardize edildiği bu tip çalışmalar yeterli zaman içersinde yapıldığında, en az hata taşıyan tekrarlanabilir sonuçların elde edilebileceği gözlemlendi. Sıvı besiyerinde yapılan deneylerde, optimum antibiyotik konsantrasyonu saptanırken; standart koşullarda yeterli zaman aralığında çalışılması gerektiği kanısına varıldı.

S U M M A R Y

Effects of different groups of antibiotics on logarithmic growth of *Escherichia coli* strains isolated from clinical sources.

Effects of different groups of antibiotics on logarithmic growth of *Escherichia coli* strains isolated from clinical sources have been searched. As different groups of antibiotics, Ampicillin from Penisillins, Cefoperazone from third generation Cephalosporins, Oxytetracycline from Tetracyclines, Gentamycin from Aminoglycosides have been selected. Optimum growth conditions has been detected and standardized in aerated DST Broth. Optical density of cultures and numbers of colony forming unit in per milliliter depend on time have been found in 495 nm. determined as optimum wave-length. Standard growth curves have been obtained by plotting them in semi-logarithmic paper. The effect of each antibiotic with different concentrations in related to production period and growth conditions has been tested by measuring optical density.

The effect of antibiotics on logarithmic growth of *E. coli* strains has changed by depending on their effective concentrations in media and experimental time. It has been observed that repeatable results with minimum faults can be obtained when experiments with standardized conditions have been made within sufficient time intervals. We have concluded that while optimum antibiotic concentration is being found in experiments made under fluid media, tests should be made within sufficient time intervals under standard conditions.

F - K A Y N A K L A R

1. Bilgehan, H. (1983). Klinik Mikrobiyoloji.
s: 42-45. Bilgehan basımevi - İzmir.
2. Öktem, Ziya. (1967). Tıbbi Bakteriyoloji II.
s: 188-208 Menteş Kitabevi - İstanbul.
3. Burrows, W. (1973). Textbook of Microbiology.
s: 57-58, 472-76. W.B. Saunders Co. Philadelphia.
4. Ingledew, W.J. ve Robert, K.P. (1984). The respiratory chains of Escherichia coli. Microbiol Rev. 48(3):
222-271.
5. Smith, A.L. (1973). Principles of microbiology.
s: 340-363 . C.V. Mosby Co. Newyork.
6. Lancini, G. ve Parenti, F. (1982). Antibiotics An Integrated View, s: 1-150. Springer-Verlag Inc. Newyork.
7. Osborn, M.S. ve Wu, H.C.P. (1980). Proteins of the outer membrane of Gram negative bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34: 369-422.
8. Wilson, G.S. ve Miles, A. (1975). Principles of Bacteriology. Virology And Immunity (1). s: 116-144. Edward Arnold Ltd. - London
9. Jawetz, E. Melnick, J.L. ve Adelberg E.A. (1976). Tıbbi Mikrobiyoloji. Akman, M ve Gülmezoğlu, E. (çev.) Hacettepe Üni. Yayını. - Ankara

10. Okuyan, M. (1983). Temel Mikrobiyoloji Ders Notları. Dokuz Eylül Üni. Tıp Fak. Mikrobiyoloji Ana Bil. Dal. İzmir.
11. Gilbert, P. (1985). The theory and relevance of continuous culture. J. Antimicrob Chemother 15, Suppl A:1-6.
12. Dalhoff, A. (1985). Differences between bacteria grown in vitro and in vivo. J. Antimicrob Chemother 15, suppl. A.: 175-195
13. Brown, M.R.W. ve Williams, P. (1985). Influence of substrate limitation and growth phase on sensitivity to antimicrobial agents. J Antimicrob Chemother 15, Suppl A : 7-14
14. Jawetz, E. Melnick, J.L. ve Edward A.A. (1980). Review of Medical Microbiology. s: 86-91. Lange Medical publications. - California.
15. Selwyn, S. (1980). The Beta-Lactam Antibiotics: Penicillins and cephalosporins in Perspective. s: 130-243. Hodder and stoughton Ltd. - London.
16. Kagan, M.B. (1974). Antimicrobial Therapy. s: 3-50. W.B. Saunders Co. - Philadelphia.
17. Barry, L.A. (1972). Antimicrobial Susceptibility Testing. (infectious Diseases'nın içinden) s: 125-132. Harper and Row Publisher Inc. - Newyork.
18. Glasby, J.S. (1979). Encyclopaedia of Antibiotics. s: 36-234, 430. John Wiley Sons.Ltd. - Newyork.

19. Reeves, D.S. Phillips, I. Williams, J.D. ve Wise R. (ed). (1978). Laboratory Methods in Antimicrobial Chemotherapy, Churchill livingstone Inc. - London.
20. Lyon, J.A. (1983). Cefoperazone (Cefobid, pfizer) Drug Intell Clin Pharm 17 (1): 7-11.
21. Mitsuhashi, S. Minami, S. Matsubora, N. Yotsuji. A. ve Kurashige, S. (1980). In vitro and in vivo antibacterial activity of cefoperazone. Clin ther. V.3 Special issue: 1-14.
22. Kunin, C.M. (1985). The responsibility of the infectious disease community for the optimal use of antimicrobial agents. J Infect Dis 151 (3): 388-398.
23. WHO, S.W.G. (1983). Antimicrobial resistance. Bull WHO 61(3) : 383-394.
24. Normark, S. Bergstrom, S. Edlund, T. Grundstrom, T. ve Jourin, B. (1980). Bacterial defence against antibiotics. Scand J infect Dis Suppl. 24: 188-194
25. Sanders, C.C ve Sanders, W.E. (1985). Microbial resistance to newer generation B-lactam antibiotics clinical and laboratory implications. J. Infect Dis 151 (3) : 399-406.
26. WHO, S.W.G. (1983). Control of antibiotic-resistant bacteria: Memorandum from a WHO meeting. Bull WHO 61 (3) : 423-433
27. Reiner, R. (1982). Antibiotics An Introduction. s: 21-25. Thieme stratton Inc. - Newyork.
28. Terzioğlu, O. (1972). Bazı antibiyotiklerin değişik enterik bakteri suşlarının sıvı besiyerindeki üremelerine etkisi. Türk Biyoloji Dergisi, 22:141.

29. Yourassowky, E. Vander linden, M.P. lismont, Crokaert F. ve Glupczynski Y. (1985). Effect growth curve patterns of brief exposure of be to different concentrations of β . lactam anti J Antimicrob chemother 15, Suppl A. : 7-14
30. Terzioğlu, O. (1975) : Türkiyede İzole Ediler Enterik Bakterilerdeki R. Faktörlerinin Konj. Aktarım Kinetikleri ve Sınıflandırılmaları. Doktora tezi H.. Fen Fak. Biyoloji Enst. - Ankara.
31. WHO Technical Report Series no. 210 (1961) : Export committee on antibiotics. WHO Geneva.
32. Yılmaz, . (1985) : İzmir yöresinde değişik kaynaklardan izole edilen patojen staphylococcus'ların değişik kemoterapotik ajanlara karşı duyarlılık durumları. Y.Lisans Tezi D.E.. Sağlık Bil.Enst. - İzmir.
33. Weinbren M.J. ve Perinpanayagam R.M. (1985). Test for B-lactamase production. Lancet II(8456) : 673-674.