

T. C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇAY POLİFENOLLERİNİN β -LAKTAMAZ ENZİM İNHİBİTÖR
ETKİLERİNİN ÇEŞİTLİ BAKTERİLER ÜZERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Biyolog MİNE GÜRBÜZ

**Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Mikrobiyoloji İçin
Öngördüğü YÜKSEK LİSANS TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.**

**DÜZCE
2009**

T. C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇAY POLİFENOLLERİNİN β –LAKTAMAZ ENZİM İNHİBİTÖR
ETKİLERİNİN ÇEŞİTLİ BAKTERİLER ÜZERİNDE
ARAŞTIRILMASI

Biyolog MİNE GÜRBÜZ

Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Mikrobiyoloji İçin
Öngördüğü YÜKSEK LİSANS TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Tevfik YAVUZ

DÜZCE
2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu alışma jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı	Doç. Dr. M. Tevfik YAVUZ Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD	(İmza)
Üye	Doç.Dr. İdris ŞAHİN Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD	(İmza)
Üye	Doç.Dr. Elif ÖZTÜRK Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD	(İmza)

ONAY:

Bu tez, Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.

İmza
Doç.Dr. Özlem Yavuz
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürem boyunca bana emeği geçen, gerek eğitimim, gerekse tez hazırlama dönemim boyunca her zaman desteğini gördüğüm kişiliği, bilgisi ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım Doç. Dr. M. Tevfik YAVUZ'a;

Tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, sabırla, özenle ve sevgiyle benimle bilgi ve deneyimlerini paylaşan, beni her konuda destekleyen; sevgili hocamız ve sevgili iş arkadaşımız Sayın Doç. Dr. Seval KORKMAZ' a ve Anadolu Üniversitesi Farmasötik Mikrobiyoloji A.D Başkanı Sayın Doç. Dr. Yağmur TUNALI' ya;

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'dan hocalarımız Prof. Dr. A. Demet KAYA'ya, Doç. Dr. İdris ŞAHİN'e ve Doç. Dr. C. Elif ÖZTÜRK'e;

Eğitimim süresince göstermiş oldukları anlayıştan ve iyi niyetten dolayı sevgili genel müdürümüz Sayın Dr. Eczacı Ömer Hulki OCAK olmak üzere tüm Nobelfarma İlaç ailesine; Sayın Salih PAK'a;

Tez hazırlama sırasında yardımlarını esirgemeyen sevgili asistanlarımız Dr. Şahika GÖÇMEN'e, Dr. Emel ÇALIŞKAN'a;

Gece gündüz tüm emeğiyle beraber çalıştığım, deneyim ve dostluğunu benden esirgemeyen çalışma arkadaşım sevgili Bio. Ziya ERDOĞAN'a;

Bugünlere gelmemde hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve beni hep destekleyen sevgili anneme, sevgili babama, biricik halam Gülay DİLMEN'e başta olmak üzere tüm aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bana her zaman, her konuda destek olan; ilgi ve sevgisi ile hep yanımda olan sevgili eşim Burak GÜRBÜZ'e ve hayat ağacım olan biricik oğlum Mertcan GÜRBÜZ'e beni destekledikleri için teşekkür ederim.

Mine GÜRBÜZ

Düzce - 2009

ÖZET

Klinikte bakteri infeksiyonlarında yaygın ve sık olarak kullanılan β -laktam antibiyotiklere karşı oluşan rezistan suşlarına etkili olabilecek yeni beta-laktamaz enzim inhibitörlerinin araştırılması önem taşıyan bir konudur. Çalışmamızda; klinikte kullanımı olası yeni beta-laktamaz enzim inhibitörleri olarak çay polifenollerinden; kateşin, kateşin gallat ve epikateşin ve epikateşin gallat'ın beta-laktamaz enzim inhibitörü özelliğine sahip olup olmadığı araştırıldı.

Bu araştırma, Mart-Nisan 2009 tarihleri arasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, klinik olarak izole edilen beta-laktam antibiyotiklere dirençli *E. coli* ve *S. aureus* kökenleri ve *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 29213 standart suşları kullanılmıştır. Çay polifenollerinin beta-laktam grubu antibiotiklerden ampisilin ve amoksisilin ile birlikte beta-laktamaz inhibitör etkisi, izole edilen bakteriler üzerinde araştırıldı. Kontrol grubu olarak ampisilin/sulbaktam ve amoksisilin/klavulanat kombinasyonları kullanıldı. Antibiyotiklerin etkinliklerinin ölçülmesi için kullanılan yöntem "Clinical Laboratory Standarts Institute" ta yer alan dilüsyon metodları uygulanarak araştırıldı. Enzim izolasyonu ve aktivasyonu kromojenik yöntem (nitrosefin) metodu ile test edildi.

Yapılan çalışmalarda *Echerichia coli* ve *Staphylococcus aureus* kökenlerinde ampisilin-epikateşin, epikateşin gallat ve kateşin gallatlı kombinasyonları ile amoksisilin-epikateşin ve epikateşin gallat kombinasyonların uygulanmasında elde edilen MİK değerlerinin kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü. Bu antibiyotikler ile birlikte çay polifenollerinin sinerjik etkileri kanıtlanmış olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: β -laktamaz inhibisyonu, *S. aureus*, *E. coli*, çay polifenolleri

ABSTRACT

It is an important subject that to research new beta-lactamase enzyme inhibitors which can be effective to β -lactam antibiotics for resistant strains of bacteria infection used clinically. In this study, whether new beta-lactamase enzyme inhibitors for tea polyphenol as catechin, catechin gallate, epicatechin and epicatechin gallate used probably clinically have this characteristic or not were investigated.

This study was performed between March and April 2009 in Düzce University, Faculty of Medicine, Microbiology and Clinical Microbiology Laboratory Department. Standard strains as *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* and *S. aureus* sources which resistant beta-lactam antibiotics isolated clinically were used. Beta-lactamase inhibitor effects of tea polyphenol and beta-lactam antibiotics as ampicillin and amoxicillin were researched on isolated bacteria. Ampicillin/sulbactam and amoxicillin/clavulanate combinations were used as control group. Method for measuring of antibiotics effect were researched imposing dilution methods in "Clinical Laboratory Standards Institute". Enzyme isolation and activation were tested to used chromogenic method (nitrocefim).

In the study, MIC values were decreased pointedly by *E. coli* and *S. aureus* sources performed ampicillin-epicatechin, epicatechin gallate and catechin gallate combinations with amoxicillin-epicatechin and epicatechin gallate according to control groups. Synergic effects of this antibiotics and tea polyphenols are proven.

Keywords: B-lactamase inhibition, *S. aureus*, *E. coli* and tea polyphenols.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
TABLolar.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>E.coli</i>	3
2.2. <i>S.aureus</i>	5
2.3. Beta-laktam Antibiyotikler.....	7
2.4. Beta-laktamazlar.....	9
2.5. Beta-laktamaz İnhibitörleri.....	14
2.5.1. Klavulanik asit.....	14
2.5.2. Sulbaktam.....	14
2.5.3. Tazobaktam.....	15
2.6. Çay Polifenolleri.....	15
2.6.1. Epigallokateşin gallat.....	16
2.6.2. Epikeşin gallat.....	16
3. ARAÇ GEREÇLER VE YÖNTEM.....	18
3.1. Kullanılan Gereçler ve Laboratuar Ekipmanları.....	18
3.2. Kullanılan Besiyerleri.....	19
3.1.1. Mueller hinton broth.....	19
3.1.2. Triptik soy broth.....	19
3.1.3. Triptik soy agar.....	19
3.3. Kullanılan Bakteriler ve Süspansiyonlarının Hazırlanması.....	19
3.3.1. İnokulumdeki mikroorganizmaların saptanması.....	20

3.4. Çalışmada Kullanılan Antibiyotik ve Çözeltiler.....	20
3.5. Mikrodilüsyon Sıvı Yöntemi.....	21
3.6. Beta-laktamaz Testinin Uygulanışı.....	22
3.6.1. Kromojenik sefalosporin yöntemi (Nitrosefin).....	22
3.7. Çalışmada Kullanılan Antibiyotiklerin MİK Noktalarının Belirlenmesi.....	22
4. BULGULAR.....	24
4.1. Elde Edilen Bulgular.....	24
4.2. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	26
4.2.1. <i>E.coli</i> için ampisilin ve çay polifenol gruplarının karşılaştırılması.....	26
4.2.2. <i>E.coli</i> için amoksisilin ve çay polifenol gruplarının karşılaştırılması....	27
4.2.3. <i>S.aureus</i> için ampisilin ve çay polifenol gruplarının karşılaştırılması....	28
4.2.4. <i>S.aureus</i> için amoksisilin ve çay polifenol gruplarının karşılaştırılması..	29
5. TARTIŞMA.....	30
6. SONUÇ.....	36
7.KAYNAKLAR.....	37

SİMGELER ve KISALTMALAR

AM	Ampisilin
AMC	Amoksisilin/klavulanik asit
ATCC	American Type Culture Collection
β- Laktam	Beta-laktam
β- Laktamaz	Beta-laktamaz
CG	Kateşin gallat
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
DMSO	Dimetil sülfoksit
EC	Epikateşin
ECG	Epikateşin gallat
EGCG	Epigallokateşin gallat
EGC	Epigallokateşin
GSLB	Geniş spektrumlu Beta Laktamaz
MHB	Mueller-Hinton Broth
MİK	Minumum inhibisyon konsantrasyonu
MRSA	Metil – resistans <i>S. aureus</i>
μg	Mikrogram
LPS	Lipopoli sakkarit
SAM	Sulbaktam/ampisilin
PBP	Penisilin bağlayan protein

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Gram negatif bakterilerde hüvre duvar yapısı

Şekil 2.2. Gram pozitif bakterilerde hüvre duvar yapısı

Şekil 2.3. Çay polifenollerindeki kateşinlerin yapıları

TABLÖLAR

Tablo 2.1. Beta -laktam antibiyotiklerin sınıflandırılması

Tablo 2.2. Beta-laktamaz çeşitleri

Tablo 3.1. Antibiyotikler için çözücü ve sulandırıcılar

Tablo 3.2. *S.aureus* ve *E.coli* için kullanılan antibiyotik konsantrasyonları (mcg/mL)

Tablo 3.3. *S.aureus*'da kullanılan çay polifenollerini ile antibiyotik konsantrasyonlarının MİK değerlerinin eşleştirilmesi ($\mu\text{g/mL}$).

Tablo 3.4. *E.coli*'de kullanılan çay polifenollerini ile antibiyotik konsantrasyonlarının MİK değerlerinin eşleştirilmesi ($\mu\text{g/mL}$)

Tablo 4.1. Ampisilin, ampisilin+sulbaktam ile çay polifenollerinin *E.coli* deney grupları üzerindeki MİK (mcg/ml) değerleri

Tablo 4.2. Amoksisilin, amoksisilin+klavulanat ile çay polifenollerinin *E.coli* deney grupları üzerindeki MİK (mcg/ml) değerleri

Tablo 4.3. Ampisilin, ampisilin+sulbaktam ile çay polifenollerinin *S.aureus* deney grupları üzerindeki MİK (mcg/ml) değerleri

Tablo 4.4. Amoksisilin, amoksisilin+klavulanat ile çay polifenollerinin *S.aureus* deney grupları üzerindeki MİK (mcg/ml) değerleri

Tablo 4.5. *E. coli* için ampisilin gruplarının karşılaştırılması

Tablo 4.6. *E. coli* için amoksisilin gruplarının karşılaştırılması

Tablo 4.7. *S.aureus* için ampisilin gruplarının karşılaştırılması

Tablo 4.8. *S.aureus* için amoksisilin gruplarının karşılaştırılması

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Beta-laktam antibiyotikler, infeksiyonlarda en sık kullanılan antibiyotik türevlerinin başında gelmektedir. Aşırı duyarlılık reaksiyonları dışında önemli bir yan etkileri bulunmaması nedeniyle günümüzde en sık kullanılan antimikrobiyal ajanlardır. Yaygın olarak kullanılan β -laktam antibiyotiklere direnç gelişmektedir (Acar ve ark., 1985; Gür, 1994).

Antibiyotiklere karşı direnç oluşumu ilk defa 1940 yılında Abraham ve Chain tarafından *Escherichia coli*' de penisilini yıkan bir enzim varlığının gösterilmesi ile ortaya koyulmuştur. Daha sonra Kirby,1944 yılında stafilokokların penisilini yıkan bir ekstraktı olduğunu göstermiştir (Neu, 1984).

β -laktam grubu antibiyotiklere direnç geliştirilmesinde başlıca üç mekanizma rol oynamaktadır (Neu, 1984; Laden ve ark., 1985; Yüce, 1988b; Mayer ve ark., 1990).

1.Enzimatik inaktivasyon: En belirgin olarak β -laktamazlarla gözlenmektedir. Acyclase, esterase, dehydropeptidase gibi enzimlerde daha düşük düzeyde ve daha zayıf aktivasyona neden olmaktadır (Tilton ve ark., 1987).

2.Hedef enzimde değişiklik: β -laktam grubu antibiyotiklerin bakterilere etki edebilmesi için sitoplazmik membran üzerinde yer alan ve bakteride peptidoglikan sentezini yöneten enzimler olan Penisilin Bağlayan Protein (PBP)' lere bağlanması gerekmektedir. Bu enzimlerin afinitesindeki değişiklikler, antibiyotik molekülünün bağlanmasını engelleyerek dirence neden olmaktadır.

3.Hücre duvarından antibiyotik molekülünün geçişinin önlenmesi: Bakteri hücre duvarındaki porus yapılarının sayısındaki azalma antibiyotik molekülünün hücre içerisine girmesini ve PBP'lere bağlanmasını engeller. Bu mekanizma gram olumsuz bakterilerde penisilinaza dirençli penisilinlere karşı oluşan dirence örnektir (Acar ve ark., 1985).

β -laktam antibiyotiklere karşı oluşan direçte en sık gözlenen mekanizma, beta laktamaz (β -laktamaz) enzimleri ile bu antibiyotiklerin inaktive edilmesidir (Mediros ve ark., 1984; Salyers ve ark., 1994; Quintiliani ve ark., 1995).

Klinik kullanımda β -laktamaz inhibitörü olarak kullanılan sadece üç madde vardır (klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam) ve bunlar kendileri antibakteriyel etkiye sahip olmamasına rağmen bakterilerde beta-laktam antibiyotiklerin etkilerini engelleyecek mekanizmayı bozdukları için bunlarla kombine preparat halinde kullanılırlar. Ancak etkili kombinasyonlar sınırlıdır ve β -laktam antibiyotiklere rezistan suşlar sürekli gelişmektedir. Bu sebeple yeni kombinasyonlar oluşturulabilecek yeni beta-laktamaz inhibitörlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Japonya'da Komatsu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakterilere değişik antibiyotikler uygulanmış ve çalışmamızda yapmayı planladığımız duyarlılık testleri kullanılmıştır (Komatsu ve ark., 2003). Pek çok çalışmada yer alan bu testler "Clinical Laboratory Standarts Institute" tarafından patojen mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılığının test edilmesi için kullanılmakta olan standardize edilmiş testlerdir. Çalışmamızda yine bu standart testlerden biri olan mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı.

Enzim izolasyonu ve aktivasyonu kromojenik yöntem (nitrosefin) metodu ile test edildi. Sık görülen infeksiyon etkenlerinden olan beta-laktamaz enzimine sahip *Echerichia coli* ve *Staphylacoccus aureus* bakterileri kullanıldı.

Çalışmamızın amacı, klinikte yaygın ve sık görülen bakteri infeksiyonlarının rezistan suşlarına karşı etkili olabilecek yeni beta-laktamaz enzim inhibitörlerinin klinik kullanıma sunulmasıdır. Epigallokateşin gallat (EGCG) ile aynı grubun yaptığı iki çalışmada EGCG'nin *S. aureus*'ta beta-laktamaz inhibitör etkisinden bahsedilmektedir (Zhao ve ark., 2002). Yapılan benzer çalışmalardan yola çıkarak diğer çay polifenollerini olan epikateşin, epikateşin gallat, kateşin hidrat, kateşin gallat gibi doğal kimyasal bileşikler, klinikte kullanımı olası β -laktam grubu antibiyotiklerle birlikte kullanılarak yeni beta-laktamaz enzim inhibitörleri olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmak için bu çalışma yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *E.coli*

Escherichia coli, ilk kez 1855 yılında Escherich adında bir araştırmacı tarafından infantların dışkılarından izole edilmiş ve *Bacterium coli* olarak adlandırılmıştır. Daha sonraları izole eden kişinin adı verilerek *Escherichia coli* olarak tanımlanmıştır (Bilgehan, 2004a; Baron ve ark., 1994).

Enterobacteriaceae familyası içerisinde yer alan, kuşların ve memelilerin normal barsak florasında bulunan *E. coli*, 2–6 µm boyunda, 1–1,5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak bir gram negatif basildir. Genellikle etraflarında bulunan kirpikleri aracılığıyla hareketli olmakla beraber hareketleri yavaştır. Bazı suşlarda kapsül veya mikrokapsül bulunmaktadır (Bilgehan, 2004a; Baron ve ark., 1994).

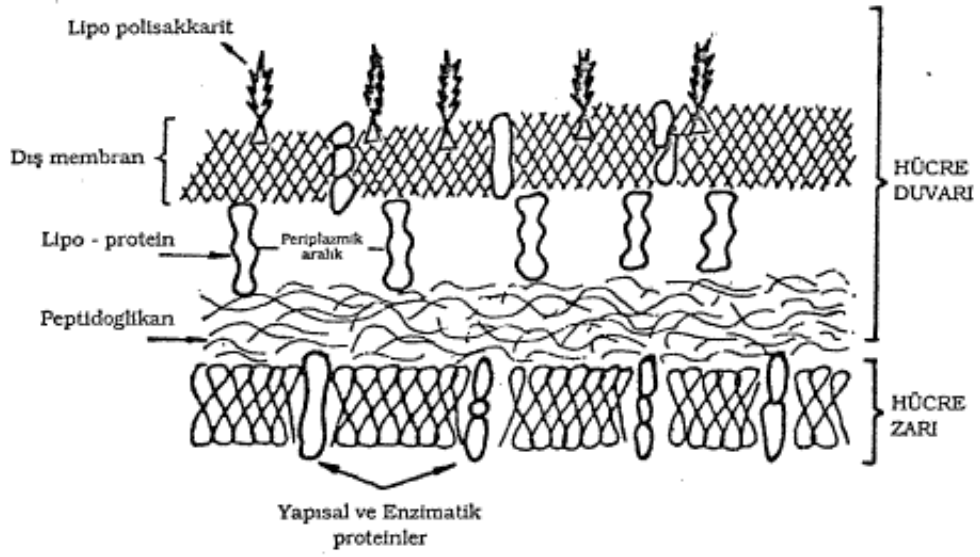
Fakültatif anaerob olup 15–45 derecelerde üreyebilmekle birlikte optimal üreme ısıları 37°C'dir. Ortalama pH 7–7,2' de, buyyon ve jeloz gibi genel besiyerlerinde kolayca ürerler. Buyyon ve peptonlu suda yoğun üreme gösterirler ve homojen bulanıklık yaparlar. Agarda genellikle 2–3 mm çapında parlak, düzgün kenarlı, konveks, gri-beyaz renkte S tipi koloniler yaparlar. Tekrarlanan pasajlarda ise kaba-mat ve granüler R tipi koloniler oluştururlar. Bazı kökenler, özellikle idrar yolu infeksiyonlarından soyutlananlar kanlı agarda hemoliz yapabilirler. Kapsüllü suşlar ise mukoid koloniler oluşturabilirler. Şekerleri ve diğer karbonhidratları asit ve gaz oluşturarak parçalarlar. Laktoza olan etkileri ve gaz oluşturması diğer barsak bakterilerinden özellikle *Salmonella* ve *Shigella*'lardan ayırımında önemli bir özelliktir. Bu nedenle pratikte laktoz negatif bakterilerden ayırt edilmesinde içinde laktoz ve bir ayıraç bulunan çeşitli besiyerleri kullanılır. İçinde laktoz ve eozin, metilen mavisi bulunan EMB agarda ve içinde laktoz, sodyum sülfid, diyament fuksin içeren Endo agarda mavi- siyah yeşilimsi parlaklık veren koloniler oluştururken McConkey ve *Salmonella-Shigella* (SS) agarda kırmızı koloniler oluştururlar (Bilgehan, 2004a; Baron ve ark., 1994; Ryan, 1994).

E. coli bakterilerinin IMVIC olarak bilinen biyokimyasal özellikleri (Tryptofandan indol oluşturma, Metil kırmızısı testi, Voges Proskauer testi, sitratı kullanma) (+ + —) olarak gösterilir. Ayrıca oksidaz negatif olup üreyi parçalayamazlar. Bazı kökenleri dışında Hidrojen sülfür oluşturmazlar, ancak sisteinli besiyerinde az miktarda H₂S yaptıkları saptanmıştır. Katalaz pozitif, potasyum siyanür testi olumsuzdur (Bilgehan, 2004a; Baron ve ark., 1994).

E. coli dış etkilere oldukça dayanıklı bir bakteridir. 55°C'de bir saat, 60 °C' de 20–30 dakika, oda ısısında uzun süre canlı kalırlar. Soğuğa dirençli, dezenfektanlara karşı ise dirençsizdirler. *E. coli*'nin O (somatik), H (kirpik), K (kapsül) antijenleri bulunmaktadır. Basil, O antijenlerine göre gruplara, H ve K antijenleriyle de serovarlara ayrılır (Baron ve ark., 1994; Ryan, 1994).

1965 yılında ilk kez ampisiline dirençli *E. coli* suşları izole edilmiş ve direnci sağlayan beta-laktamaza TEM-1 adı verilmiştir (Data, ve ark., 1965). 1980'li yıllara kadar, kullanımda olan geniş spektrumlu beta-laktamların etkisine direnç yanıtı, geniş spektrumlu beta-laktamazlar olan TEM–1, onun varyantı TEM–2 ve SHV–1 olarak kalmıştır. SHV–1 *Klebsiella pneumoniae*'da genellikle kromozomal, *E.coli*' de ise genellikle plazmidik olarak bulunur.

Özellikle hastane ortamından izole edilen suşları pek çok kemoterapötik maddeye dirençlidir. İnsanda barsak dışında bir bölgeye geçiş yaptıklarında veya antibiyotik tedavisi gören kişilerde en çok üriner sistem, safra yolları, akciğer ve peritonda çeşitli infeksiyonlara sebep olabilirler; enteropatojenik ve enterotoksinojenik suşları barsakta patojeniktir; sürgünlere yol açar (Prescott ve ark., 1993).



Şekil 2.1. Gram negatif bakterilerde hücre duvar yapısı (Bilgehan, 2005'den alınmıştır).

2.2. *Staphylococcus aureus*

Tıbbi yönü en önemli olan bu stafilocok türü, ülkemizde ve tüm dünyada en yaygın hastane infeksiyonu etkenlerindedir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının ve koagülaz negative stafilocokların, hastane infeksiyonlarında büyük pay sahibi oldukları görülmektedir. Epidemiyapma potansiyelleri de bulunan stafilocoklar halk sağlığı yönünden de büyük önem taşımaktadırlar (Cengiz, 1999).

Gram olumlu koklar olup insanlarla yakın ilişki içerisinde olan bakterilerdir. Yuvarlak, katı besiyerlerinde belirgin olmak üzere düzensiz üzüm salkımına benzer kümeler bazen 3–5 kottan ibaret veya ikişerli gruplar oluşturan, tüm hücreleri birbirine benzerlik gösteren, sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüz koklardır.

Streptokoklardan en önemli ayırımı katalaz oluşturma deneyi ile yapılır. *Streptokokların* katalazı olumsuz iken, *Staphylococcusların* katalaz oluşumu olumludur.

Birçok besiyerinde üreyebilirler. En tipik üremeleri kanlı agardadır. Kolonileri yuvarlak düzgün, kabarık, mat, S tipinde olup sarı pigment ve beta hemoliz görülür.

Başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratı fermantatif olarak parçalayabilirler ve son ürün olarak laktik asit yaparlar. Oksidaz negatiftir. Gaz oluşturmazlar. Mannitole etkileri özellikle bulunmaktadır. Bu nedenle çevrelerinde sarı bir hale oluştururlar. Lizozime dirençlidirler (Bilgehan, 2004b).

S.aureus antijen özelliği gösteren çok sayıda madde mevcuttur. Hücre duvarı peptidoglikan, teikoik asit ve protein-A (SpA) şeklinde üç temel eleman taşımaktadır.

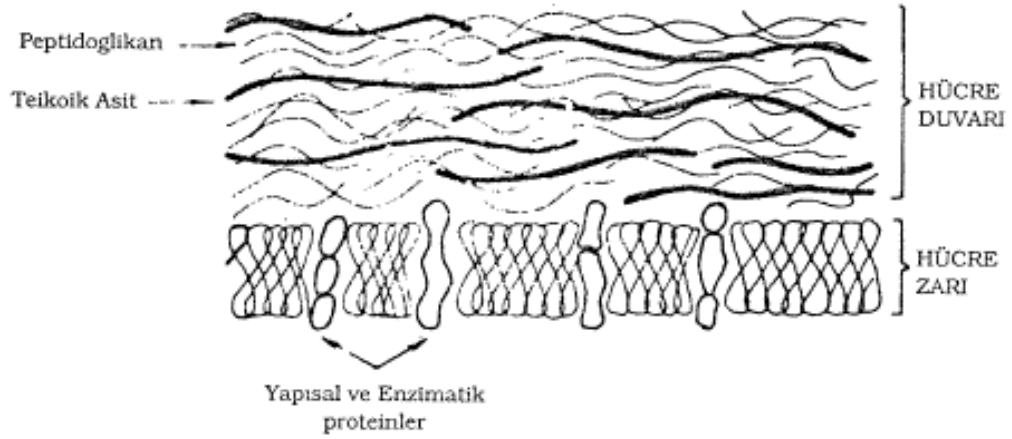
S. aureus hücre duvarında bulunan gruba özel bir antijen olan protein A, Wervey tarafından 1940'da tanımlanmıştır. Birçok memeli serumundaki IgG³ dışındaki tüm IgG ve IgA₂ ile bazı IgM'nin Fc parçası ile reaksiyon vermektedir.

Direnci kırılmış kimselerde; deride fronkül (sivilce), deri altı sivilceleri, yeni doğanlarda ve doğal kliniklerinde deri lezyonları, sepsis ve idrar yolları infeksiyonu gibi hastalıklar yaparlar (Cengiz, 1999).

Stafilokoklar genel olarak Sulfanomid ve antibiyotik maddelere karşı dirençlidirler. Penisilinlere karşı direnç plazmid kaynaklı Beta-laktamaz enzimi ile sağlanır. Novobiosine karşı duyarlıdır. Besin zehirlenmelerinde farklı derecede hastalandırıcılık özelliği gösterirler (Madigan, ve ark., 1997).

Beta-laktamaz enzimi mikroorganizmanın penisilinlere direnç sağlaması nedeni ile tedavide güçlüğüne sebep olmaktadır. Penisilinazın bakterideki yapımı bakteriyofajlar tarafından transdüksiyon suretiyle genetik olarak aktarılabilen plazmidler tarafından kontrol edilir. Direncin sebebi beta-laktam antibiyotiklere düşük afinitesi olan penisilin bağlayan 2a veya 2'(PBP 2a) olarak adlandırılan proteindir. Bu protein bakteri kromozomunda lokalize *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. *mecA* genine sahip suşlar metisiline intrensik direnç gösterirler ve

tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençlidirler. Tedavilerinde antibiyogramla ilaç seçimi önemlidir (Madigan, ve ark., 1997).



Şekil 2.2. Gram pozitif bakterilerde hücre duvar yapısı (Bilgehan, 2005'den alınmıştır).

2.3. Beta – laktam Antibiyotikler

Beta-laktam antibiyotiklerin tümü moleküllerin çekirdek kısmında beta-laktam halkası içerirler. Beta-laktam halkası bir azot ve üç karbon içeren doymuş bir halkadır. Bu halka hüce duvarı sentezinde kullanılan disakkarit peptitlerin karboksi terminali ile yapısal olarak benzerdir. Bu benzerlik yüzünden duvar sentezini sağlayan enzimler olan penisilin bağlayan protein (PBP) bu substrat yerine beta-laktam antibiyotiklere bağlanır. Enzimler bloke olur, duvar sentezi duran bakteri ölür (Töreci, 1991).

Tablo 2.1. Beta -laktam antibiyotiklerin sınıflandırılması (Özgüven, 2008).

<p>PENAMLAR</p> <ul style="list-style-type: none">- Metoksipenamlar (Temosilin)- Penisilinler (PenG, PenA, PENM, Karboksipenisilinler, Ureidopenisilinler, Amidinoenisilinler)- Oksapenamlar (Klavulanik asit)- Karbapenamlar
<p>PENEMLER</p> <ul style="list-style-type: none">- Oksapenemler- Sulfopenemler- Karbapenemler (Imipenem, Meropenem, Panipenem ve Biapenem)
<p>SEFEMLER</p> <ul style="list-style-type: none">- Oksasefemler- Sefalosporinler- 1. Kuşak: Sefalotin, Sefazolin, Sefaleksim, Sefadroksil, Sefaloridin, Sefapirin, Seftadin,- 2. Kuşak: Sefamandol, Sefuroksim, Sefaklor, Sefanisit, Sefarenit, <p>Lorakarbef, Sefmetazol, Sefotetan, Sefoksitin</p> <ul style="list-style-type: none">- 3. Kuşak: Sefotaksim, Seftazidim, Seftriakson, Sefiksim, Sefoperazon, Sefpodoksim, Seftizoksim- 4. Kuşak : (Geniş spektrumlu) Sefepim, Sefpirom- Sefamisinler (Sefoksitin, Sefotetan, Sefmetazol)- Karbesefemler
<p>MONOLAKTAMLAR</p> <ul style="list-style-type: none">- Nokardisinler- Monobaktamlar (Aztreonam)- Monofosfamlar- Monokarbamlar- Monosulfaktamlar

2.4. Beta – laktamazlar

Beta-laktamaz enzimleri bakteriyel penisilin bağlayan protein (PBP)'lerde reaksiyona girerek hücre duvarı sentezini bozan beta-laktam halkasını hidrolize etmek suretiyle etki eder. Bu halka hidrolize olunca antibiyotik aktiviteleri bozulur (Eraksoy, 1989).

Beta – laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü kurup siklik amid bağımlı bozar ve bir açıl-enzim türevi oluştururlar. Bu enzim penisilloil veya bir enzim sefalosporil molekülüdür.

Reaksiyonu gerçekleştiren üç grup molekül vardır:

- Düşük molekül ağırlıklı penisilin bağlayan proteinler (PBP) (D-D karboksi peptidazlar)
- Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler (Transpeptidazlar)
- Beta- laktamazlar.

Bütün PBP' ler ve beta-laktamazların çoğu aktif bölgelerinde bir serin aminoasidi bulunan ve bu nedenle “serin peptidazlar” olarak adlandırılan bir enzim üst ailesinde yer alırlar. Bu enzimlerin beta-laktam ajanlara bağlanması sırasında önce bir açıl-enzim türevi oluşturmaktadır. Bunu izleyen basamakta ise, bir deaçilasyon işlemi ile enzim açıl molekülünden ayrılarak rejenere olur. PBP' ler ve beta-laktamazlar arasındaki farkı bu deaçilasyon basamağının hızı oluşturur. Beta-laktamazlar açıl türevinden kısa sürede ayrılırken PBP' lerde bu basamak gerçekleşmez ve antibiyotik yerine enzimin inaktivasyonu ile sonlanır.

Beta – Laktamaz Çeşitleri: Beta-laktamazlar moleküler yapılarına ve işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılırlar.(Tablo2.2.) Molekül yapılarına göre 4 farklı sınıflandırılırlar.(A, B, C, D)

A, B ve D moleküler sınıflarında bulunan beta-laktamazlar serin-ester aracılıklı mekanizma ile işlev görürler. Sınıf B beta-laktamazlar ise, kofaktör olarak çinko (Zn^{+2}) iyonu gereksinir.

Sınıf A'nın substratı penisilinlerdir. Bu grup enzimler içerisinde *Staphylococcus aureus* 'un beta-laktamazları (Grup 2a) ve Gram negatif bakterilerin TEM ve SHV tipi enzimleri (Grup 2b, 2be, 2br) sayılabilir. Sınıf B (Grup 3) metallobeta-laktamazlar, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacteroides fragilis*, *Aeromonas* ve *Legionella spp.*'de saptanabilen, penisilinler ve sefalosporinlerin yanısıra karbapenemleri de hidrolize eden beta-laktamaz inhibitörleri ile inaktive olmayan enzimlerdir.

Tablo 2.2. Beta-laktamaz çeşitleri (Bush ve ark., 1995).

Grup	Moleküler Sınıf	Substrat	Enzim
1	C	Sefalosporinler	Kromozomal ve plazmid kökenli AmpC tipi enzimler (CMY1,2)
2a	A	Penisilinler	Gram(+) bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, sefalosporinler	TEM-1,TEM-2,SHV-1
2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler	TEM-3-TEM-29,TEM-46-TEM-49;SHV-2-SHV-9;PER-1
2br	A	Penisilinler	TEM-30-TEM-41,TEM-44-TEM-45(IRT 1-14),TRC-1,SHV-10
2c	A	Penisilinler	PSE1,PSE-3,PSE-4
2d	D	Penisilinler, oksasilin	OXA-1-OXA-11,OXA-14-OXA-17
2e	A	Sefalosporinler	<i>Proteus vulgaris</i> 'in indüklenebilir beta-laktamazı
2f	A	Penisilinler, sefalosporin karbapenemler	<i>Enteobakter cloacae</i> 'nin NMC-A' si <i>Serratia marcescens</i> 'in Sme-1' i
3	B	Karbapenemler dahil birçok beta-laktam	-
4	?	Penisilinler	<i>Burkholderia cepacia</i> 'nın penisilinazı

Gram negatif bakterilerde bulunan sınıf C beta-laktamazlar (Amp C; Grup 1), kromozomal ve plazmid kökenli sefalosporinazları ve sınıf D beta-laktamazlar da (Grup 2d) oksasilini hidrolize eden enzimleri kapsamaktadır.

Beta-laktamazlar arasında TEM ve SHV grubu enzimler, mikrobiyoloji laboratuvarında sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları ve plazmidlerce taşınmaları nedeniyle klinik önem açısından ön planda gelmektedir. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta-laktamazları, penisilinler ve 1.kuşak sefalosporinleri etkin bir biçimde parçaladıkları halde, sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlara kısıtlı etki gösterirler. Ancak 80’li yıllardan başlayarak genişlemiş spektrumlu beta –laktam ajanların klinik tedavide yaygın kullanım sonucunda, bu enzimleri kodlayan genlerdeki nokta mutasyonlarına bağlı olarak yeni enzimler gelişmiştir. Bu enzimler genişlemiş spektrumlu beta-laktam ajanları inaktive edebilmekte ve bu nedenle genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (Extended spectrum beta-lactamases; ESBL) olarak adlandırılmaktadır (Grup 2be). ESBL’lerin günümüzde sayıları 50 civarındadır ve en sık *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumonia* suşlarında bulunmakta ve bu türler ile oluşan infeksiyonların tedavisinde sorun yaratmaktadır. Gerek TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gerekse bunların genişlemiş spektrumlu türevleri, klavulanik asit, tazobaktam ve daha az oranda sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Son yıllarda, penisiline etkili, ancak klavulanik asite dirençli TEM benzeri enzimler de bildirilmiştir. (Grup 2br; inhibitör-rezistan TEM; IRT).

Penisilin Bağlayan Protein Değişimleri: Hedef yapısındaki değişim sonucunda antibiyotiğin bağlanamaması beta-laktam antibiyotiklere dirençte önemli bir diğer mekanizmadır. Dirençli suşların penisilin bağlayan proteinlerinin bağlanma özelliklerinde değişim meydana geldiği görülür. Penisilin bağlayan proteinler (PBP) peptidoglikan sentezinde yer alan enzimlerdir. Bunlar arasında transpeptidazlar “yüksek molekül ağırlıklı PBP”; D-D karboksipeptidazlar ise “düşük molekül ağırlıklı PBP” olarak adlandırılırlar. PBP değişimine bağlı direnç, Gram pozitif bakterilerde daha fazla görülmektedir ve günümüzde özellikle *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* gibi türlerin beta-laktam ajanlarla tedavisinde sorun yaratmaktadır. Bu tip dirence yol açan genetik özellikler arasında en iyi

incelenmiş olanı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında bulunan **mec A** genidir. Bu gen, beta-laktam ajanlara hiç bağlanmayan veya düşük oranda bağlanan **PBP 2a** olarak adlandırılan yeni bir penisilin bağlayan protein yapımına neden olur. Bu yeni tip protein üreten bakteriler beta-laktamantibiyotik varlığında da peptidoglikan sentezini sürdürürler.

Diğer bir direnç olayı da *S. pneumoniae* suşlarında beta-laktam afinitesinin azalmasına neden olan PBP değişimleri görülebilir. Penisiline duyarlı pnömokok suşlarında PBPB 1a, 1b, 2a, 2b, 2x ve 3 olarak numaralandırılan altı PBP bulunmaktadır. PBP 1a, 2b ve 2x' deki değişimler penisilin ve sefalosporin direncine yol açmaktadır. Bu değişimlerin nokta mutasyonlarından değil, penisiline dirençli yakın bir türden gelen yabancı DNA'dan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu iki direnç olayı yanında, Gram negatif bakterilerin porin değişikliklerine bağlı olarak geçirgenliğin azalması da direnç gelişimi olarak görülür. Aktif pompa sistemleri ile beta-laktam antibiyotiğin hücre içinde birikmesi engellenebilir (Gülay, 1999).

Hidrolize ederek beta-laktam grubu antibiyotikleri inaktivite eden enzimlerdir. Bu hidrolizasyon ile penisilinler penisiloik aside, sefalosporinler sefalosporoik aside parçalanırlar. Oluşan bu ürünlerin antimikrobik aktiviteleri yoktur (Neu, 1984; Laden ve ark., 1985; Acar ve ark., 1986; Neu, 1986; Yüce, 1988b; Hoeprich, 1990; Mayer ve ark., 1990).

Beta-laktamaz genleri bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanlarında bulunabilir. Beta laktamazlar sentezlendikten sonra sitoplazmik membrana çeşitli dercelerde bağlı olarak bulunurlar. Bu bağlanma derecesi enzimin salınma aktivitesini etkiler (Acar, 1985). Gram pozitif bakterilerde bağlanma çok zayıftır ve doğrudan dış ortama salınır. Yani ekzoenzim yapısındadırlar (Neu, 1986).

Gram negatiflerde ise, beta-laktamazlar periplazmik aralıkta bulunurlar (Curtis ve ark., 1972; Mayer ve ark., 1990; Livermore, 1997; Gülay, 2003).

Gram pozitif ve gram negatif bakterilerde, hücre duvarı yapısının farklılığından dolayı beta laktamaz grubu antibiyotiklerle farklı ilişkilere yol

açmaktadır (Neu, 1986). Bu nedenle gram negatif bakteri türlerinde beta-laktamazlara bağlı direnç sıklıkla ilaç geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar da rol almaktadır (Cornaglia ve ark., 2006).

Gram pozitif bakterilerde hücre duvarı kalın bir peptidoglikan tabakası içermektedir. Dış membran ise içermez. Eğer dış ortamda bakteri tarafından salgılanmış beta-laktamazlar yok ise antibiyotik molekülü, peptidoglikan katmanını kolaylıkla geçerek PBP' lere ulaşabilmektedir.

Gram negatif bakterilerde ise peptidoglikan katmanı incedir; dış kısmında lipopolisakkarit ve fosfoipitlerden oluşmuş bir dış membran vardır. Bu dış membran üzerinde "porus" adı verilen kanal şeklinde yapılar bulunur. Dış membran, hidrofobik bir bariyer oluşturarak bakteriyi beta-laktam antibiyotiklerden korur ve ancak çok az bir kısmının porus'lardan içeriye girmesine izin verir. İçeriye giren antibiyotik molekülleri ise PBP'lere ulaşmadan periplazmik aralıktaki beta-laktamazlarla inaktivite edilir. (Neu, 1985; Neu, 1986). Bu durumda antibiyotiğin periplazmik aralığa difüzyon hızı ve bakteri tarafından oluşturulan beta-laktamaz miktarı inhibisyonun derecesini belirlemektedir.

Beta-laktamazlara direnç; Bakterilerde duvar oluşumunda etkili karboksipeptidaz, transpeptidaz ve endopeptidaz etkinliğindeki enzimle penisilini bağladığı için bunlara penisilin bağlayan protein (PBP) denir. Beta-laktam antibiyotikler, bu enzimlere bağlanarak enzimin kendi substratına bağlanmasını engellemekte ve böylece duvar sentezi durmaktadır. Bu şekilde bakteri bölünemez, gelişemez veya deforme olur. Bağlanmada Beta-laktam antibiyotiğe afinitesinin azalması, PBP sayısında azalma olması veya beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yeni PBP' lerin sentezlenmesi sonucu oluşabilmektedir. Bunların tümü kromozomal mutasyon sonucu ortaya çıkar (Amyes ve ark., 1992; Livermore ve ark., 1995; Gür, 2000).

S. aureus 'un ürettiği beta-laktamazlar çoğunlukla plazmid üzerine kodlanmıştır (Bush, 1989).

2.5. Beta – laktamaz İnhibitörleri

2.5.1. Klavulanik asit

Klavulanik asit *Streptomyces clavurigeris*’ den elde edilen klavam türevi antibiyotiktir. Beyaz, çoğunlukla beyaza yakın, higroskopik, kristal tozudur. Suda, alkol ve asetonunda güçlü çözünür. Sudaki %1 solüsyonunun Ph ‘sı 5.5 – 7.5 dir. Hava almayan kaplarda saklanmaktadır. Klavulanik asit düşük antibakteriyel etkiye sahiptir. Bakterinin hücre duvarına sızar ve yapışır. Böylece her iki tarafta da ekstrasellüler enzimi inaktif edebilir. Bu partiküler enzim inhibitörü, geridönüşümsüz ve rekabetçi bir inhibitördür. Penisilin ve sefalosporin ile birlikte birçok direçli bakterilere karşı kullanılmaktadır. Kromozomal tip – 1 beta laktamazlara karşı genellikle düşük etkisi olmakla beraber *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia spp.* ve *Pseudomonas aeruginosa*’ ya karşı direnci sürmektedir. Bazı *Klebsiella pneumoniae*, diğer birkaç *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas aeruginosa* ‘ da bulunan plazmid ile oluşan ile geniş spektrumlu beta laktamazlara etki etmezler (Sweetman, 2002).

2.5.2. Sulbaktam

Sulbaktam, beyaza yakın kristal tozudur. Suda ve dilue asitte çözünür. Etil asetat, kloroform ve asetonunda kısmi olarak çözünür. Genellikle zayıf antibakteriyel etkilidir. Neisseria haricinde plazmid aracılığıyla veya kromozomal beta laktamazlara geri dönüşümsüz olarak diğer beta laktamaz inhibitörü klavulanik asit gibi geri dönüşümsüz olarak etki eder. Klavulanik asite göre daha geniş spektrumlu olmasına rağmen beta-laktamazlara etkisi daha azdır. Sulbaktam, birçok dirençli türlere karşı penisilin ve sefalosporin aktivitelerini arttırmaktadır.

Sulbaktam oral kullanımlarda ampisilin ve sefperazon ile kombine edilerek kullanılmaktadır (Sweetman, 2002).

2.5.3. Tazobaktam

Tazobaktam, sulbaktam gibi beta-laktamaz özellik gösteren penisillanik asit türevidir. Buna rağmen diğerlerine oranla daha fazla etkiye sahiptir. Beta laktamaz üreten bakterilere karşı potansiyel olarak artan etkisi bulunmaktadır. Bakteriyele infeksiyonlara etkili olabilmeleri için damar içine piperasilin sodyum ile kombine olanları kullanılmalıdır. Tazobaktam ile piperasilin benzer farmokinetik özellik göstermektedirler (Sweetman, 2002).

2.6. Çay polifenolleri

Günümüzde sudan sonra en popüler içecek olan çay, Çin'in güneybatı ve Hindistan'ın kuzeydoğu kökenli çay bitkisinin (*Camellia sinensis*) assamica ve sinensis çeşitlerinin taze yapraklarından üretilmektedir (Owuor ve ark., 1998).

Dünya genelinde üretimi yapılan çaylar, yeşil çay, oolong çay ve siyah çay olmak üzere başlıca üç grup altında sınıflandırılır. Çay bitkisinden hasat edilen yaprakların, kıvrılarak hemen ısı uygulama ile kurutulmasıyla yeşilçay elde edilmektedir. Yeşil çay daha çok Japonya, Çin ve diğer Asya ülkelerinde yaygın olarak tüketilmektedir (Yang, 1999; Wang ve ark., 2000).

Çay polifenolleri zengin flavonoidler içermektedir. Yeşil çay özellikle kateşinler ve kateşin türevlerini kapsayan flavonoidlerce zengindir. Epigallokateşin galat (EGCG), epigallo kateşin (EGC), epikateşin (EC), epikateşin galat (ECG), kateşin ve kateşin gallat (CG) yeşil çayda bulunan başlıca kateşinlerdir. Kateşinler suda çözünür ve demlendiklerinde acılık, burukluk verir (Şahin ve ark.,2006).

Ağız yoluyla alımı takiben kateşinler bağırsaklarda iyi derecede emilir. Yeşil çay tüketen sağlıklı bireyleri kapsayan bir çalışmada, plazmadaki EGCG, EGC ve EC' nin seviyelerinin içilen miktarın %0.2-2'si arasında değiştiği ve maksimum konsantrasyona oral alımı takiben 1.4-2.4 saat sonra ulaşıldığı belirlenmiştir (Şahin ve ark., 2006).

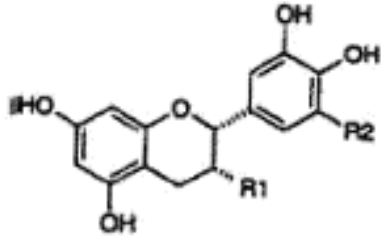
2.6.1 Epigallo kateşin gallat (EGCG)

Epigallokateşin gallat (EGCG), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'un hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasının biyosentezine ve yapısına etki ederek beta laktamazların aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Bu etki in- vitro ortamda kanıtlanmıştır (Zhao ve ark., 2002). Yine EGCG ile kombine edilmiş ampisilin-sulbaktam antibiyotiklerin etkilerinin arttığı gözlenmiştir (Hu ve ark., 2001).

2.6.2. Epikateşin gallat (ECG)

Bu maddeler yeşil çayın (*Camellia sinensis*) başlıca bileşenleridir. Epigallokateşin gallat, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'ın, metisiline ve diğer beta-laktam antibiyotiklerine karşı duyarlılığını arttırdığı görülmüştür. Kateşin ve gallatların etkileri incelenmiş ve beta laktam dirençlerinin modifiye edilmesinde epigallo kateşin galat (EGCG)' ın epikateşin galat (ECG)' dan daha etkili olduğu gözlenmiştir (Stapleton ve ark., 2003). Oxacilline karşı oluşan direnci modifiye etmede ECG' nin gallat kısmının etkili olduğu, gallik asit ve alkali gallatın ise bu modifikasyonda etkisiz olduğu görülmüştür (Stapleton ve ark., 2003).

Yine yapılan çalışmalarda; epikateşin gallat (ECG), epigallokateşin gallat (EGCG), kateşin gallat (CG) gibi gallokateşinlerin orta seviyelerindeki (6.25 ile 25 µg/ml) konsantrasyonları yüksek seviyede direnç (>256 µg/ml) gösteren beta-laktamların kırılma noktalarını aşağıya çekerek MIC seviyelerine indirme yetenekleri görülmüştür (Stapleton ve ark., 2001).



1. (-)-Epicatechin (EC)

R1 = OH

R2 = H

2. (-)-Epicatechin gallate (ECG)

R1 = Galloyl

R2 = H

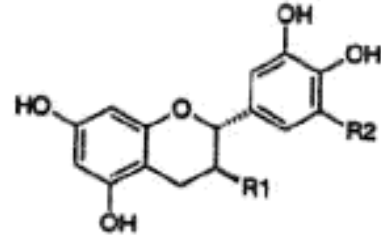
3. (-)-Epigallocatechin (EGC)

R1 = R2 = OH

4. (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)

R1 = Galloyl

R2 = OH



1. (+)-Catechin (C)

R1 = OH

R2 = H

Şekil 2.3. Çay polifenollerindeki kateşinlerin yapıları (Muthumani ve ark., 2006' dan alınmıştır).

3. ARAÇ GEREÇLER VE YÖNTEM

Bu araştırma, Mart-Nisan 2009 tarihleri arasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır. Araştırmada kullanılan mikroorganizmalar, klinik olarak izole edilen beta-laktam antibiyotiklere dirençli *E. coli* ve *S. aureus* kökenleri ve *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 29213 standart suşları kullanılmıştır.

3.1 Kullanılan Gereçler ve Laboratuvar Ekipmanları

1. Santrifüj (Nüve NF 1215, Türkiye)
2. Otoklav (Nüve NF OT 4060, Türkiye)
3. Hassas terazi (Presica XB220A, İsviçre)
4. Vorteks karıştırıcı (MS1 MINISHAKER, ThermoFisher Scientific, ABD)
5. Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)
6. Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
7. pH metre (Mettler pH 72, Seven Easy pH Meter, Çin)
8. Manyetik karıştırıcı (Heidolph DIAX 900 homogenizer, Fisher Scientific, Malezya)
9. Homojenizatör (Ultra-Turrax T25, IKA; Werke 24,000 r.p.m.j. Almanya)
10. Işık Mikroskobu (Nikon UFX-IIA, Japonya)
11. Nefolometre (BBL, ABD)

3.2. Kullanılan Besiyerleri

3.2.1. Mueller hinton broth (Difco)

Bu besiyerini hazırlamak için toz haldeki Mueller Hinton buyyonundan 21g tartılıp, Schot duran şişelerine 200 ml 'lik miktarlarda dağıtılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir. Hazırlanan bu besiyerine katyon olarak kalsiyum ve magnezyumun distile sudaki tuz çözeltileri ilave edilmiştir. Bunun için $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ve $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ kullanılarak her iki katyonunda 10 mg/ml'lik çözeltileri hazırlanıp, membran filtre tekniğiyle (Sartorius 0.2 µm) steril edilmiştir. Hazırlanan bu çözeltiler 4°C'de saklanmıştır. Mueller Hinton buyyonuna magnezyum iyonlarını içeren stok çözeltiden 25 mg/l, Kalsiyum iyonlarını içeren stok çözeltiden ise 50 mg/l olacak şekilde ilave edilerek katyon ilaveli Mueller Hinton Buyyonu hazırlanmış ve Ph ayarına bakılmıştır (25°C'de 7.2-7.4).

3.2.2. Triptik soya broth (Difco)

Toz haldeki triptik soya buyyonundan 30g tartılıp, 1000 ml distile suda çözüldükten sonra tüplere 3 ml miktarlarda dağıtarak ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.2.3. Triptik soya agar (Difco)

Toz haldeki triptik soya buyyonundan 40g tartılıp, 1000 ml distile suda çözüldükten sonra Schot duran şişelerine 200 ml 'lik miktarlarda dağıtılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir. Kullanılacağı zaman eritilerek petri kutularına uygun miktarlarda dağıtılmıştır.

3.3 Kullanılan Bakteriler ve Süspansiyonlarının Hazırlanması:

Çalışmada kullanılacak *E.coli* ve *S.aureus* bakterilerinin hem klinik olarak toplanan suşlardan beta-laktama dirençli olanlar ile *E.coli* ATCC 25922 ve *S.aureus* ATCC 29213 standart suşları kullanılmıştır. Bu bakterilerin tümünden saf kültür elde etmek için, triptik soya agar besiyerine azaltma yöntemiyle öze ile yayılarak, 35±2 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası üreyen 3–4 koloni

alınarak 3ml triptik soya broth bulunan tüplere ekim yapılmıştır. Ekim yapılan tüpler 35 ± 2 °C'lik etüvde 5 saat bekletildikten sonra, bulanıklığı steril distile su ile 0.5 McFarland standartına göre BD nefolemetre 510 000 1003 kullanılarak ayarlanmıştır. Bakteri suşları 0.5 McFarland olarak BD Spec. Calibrator Kit 440911 kullanılarak 10^8 CFU/ml içeren süspansiyonlar elde edilmiştir. Bu süspansiyonların 3.1.1 de bildirilen katyon ilaveli Mueller Hinton broth' un 1/10 oranında seyreltilmesiyle, bakterilerin inokülüm olarak kullanılan 10^6 CFU/mL'lik süspansiyonları elde edilmiştir. Bu süspansiyondan sıvı besiyerine 0.005 mL koyulduğunda, bakterinin son test konsantrasyonu yaklaşık 5×10^4 CFU/kuyucuk olmuştur.

3.3.1. İnokülümdeki mikroorganizma sayısının saptanması

Kullanılacak olan 10^6 CFU/ml'lik süspansiyonların fizyolojik tuzlu suda 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} oranlarında seyreltilmiş ve her seyreltmelerden 100'er µl alınarak petri kutularındaki triptik soya agarının yüzeyine tatbik edilmiştir. Tatbik edilen sıvı steril cam çubuk yardımı ile besiyerinin yüzeyine yayılmıştır. 24 saat 35 ± 2 °C 'lik etüvde bir gece bekletildikten sonra oluşan koloniler sayılarak mililitresindeki mikroorganizma sayısı (CFU/mL) saptanmıştır.

3.4. Çalışmada Kullanılan Antibiyotik ve Çözeltiler

Çalışmada Fargem İlaç A.Ş., tarafından temin edilen epikateşin gallat Sigma %98 Lot No: 127K1035 , kateşin gallat Sigma %98 98 Lot No: 087K1551, epikateşin Sigma %98 Lot No: 1361450, kateşin hidrat Sigma %98 Lot No: 1354270 çay polifenollerini kullanılmıştır. Antibiyotik olarak kullanılan Sulbaktam (potens %56.8) Klavulanik asit (potens %41.70) Fako İlaç ve sanayi A.Ş., Amoksisilin (potens % 94,8) ve Ampisilin (potens %98,6) Fargem İlaç A.Ş., tarafından temin edilmiştir.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2005)' e göre aşağıda belirtilen formül, antibiyotiklerin stok çözeltilerini hesaplamak için kullanılmıştır.

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

Antibiyotiklerin hazırlanması için metler PH 72 terazisi kullanılmıştır “Clinical and Laboratory Standards Institute”(2005)’ a göre kullanılan antibiyotiklerin tümünün konsantrasyonları 5120 µg/mL olarak hazırlanmıştır. Kullanılan antibiyotikler için çözücü ve sulandırıcılar tablo 3.1 ’de verilmektedir.

Tablo 3.1. Antibiyotikler için çözücü ve sulandırıcılar

Kullanılan Antibiyotik ve Maddeler	Çözücü	Sulandırıcı
Amoksisilin	Fosfat tampon pH.6.0 , 0.10 mol/L	Fosfat tampon pH.6.0 , 0.10 mol/L
Klavulanat	Fosfat tampon pH.6.0 , 0.10 mol/L	Fosfat tampon pH.6.0 , 0.10 mol/L
Ampisilin	Fosfat tampon pH.8.0 , 0.10 mol/L	Fosfat tampon pH.6.0 , 0.10 mol/L
Sulbaktam	Su	Su
Epikateşin gallate	DMSO	DMSO
Epikateşin	DMSO	DMSO
Kateşin gallate	DMSO	DMSO
Kateşin hidrat	DMSO	DMSO

3.5. Mikrodilüsyon Sıvı Yöntemi

Steril mikrodilüsyon plaklarına antibiyotik çözeltilerin Tablo.3.4 de gösterilen konsantrasyonları hazırlandı. Kuyucuklara 0.095 mL MHB doldurulmuştur. Her dizide üreme (pozitif) kontrol için mikroorganizma içeren besiyeri kuyucuğu ile negatif (inoküle edilmemiş) bir kuyucuk bırakılmıştır. 0.5 MacFarland süspansiyon (1×10^8 CFU/ml) kültürleri 1:10 oranında sulandırılıp her bir kuyucuğa 5 µl ilave edilmiştir. Antibiyotik konsantrasyonlarından 0.1 mL kuyucuklara ilave edilmiştir. Kuyucuklarda toplam hacim 0.2 ml sıvı içermiştir. İnoküle edilmiş mikrop plaklar kurumayı önlemek amacıyla parafilm ile sarılmıştır. 35 ± 2 °C ‘ de 18–20 saat aerobik koşullarda inkübe edilmiştir.

3.6. Beta-laktamaz Testinin Uygulanışı

3.6.1. Kromojenik sefalosporin yöntemi (Nitrosefin)

Beta laktamazlar nitrosefin yöntemi ile kontrol edilmektedir. Nitrosefin, beta-laktamazların çoğu için yüksek dercede duyarlılık sağlamaktadır (Livermore ve ark., 2001).

0.5 mM nitrosefin solüsyonu hazırlamak için; 2.85 mg nitrosefin tozu 0.5 mL dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek, 0.1 M fosfat buffer pH 7.0 den 9.5 ml ile karıştırılmıştır.

Test sırasında Tryptic soy agar petrilerinde 18–24 saatlik üreyen koloniler toplandı ve 20µl hacimdeki 0.1 M fosfat buffer Ph 7.0 içinde süspanse edilmiştir. Bu süspanse, nitrosefin süspanسیونu içine ilave edilerek, 1-2 dakika içinde kırmızı renk oluşumu meydana gelerek beta-laktamaz aktivitesini göstermiştir. Düşük aktivitelere renk oluşabilmesi için süre biraz uzayabilmektedir. Yinede 10 dakikadan uzun süren sonuçlar şüpheli olarak görülmelidir. (Livermore ve ark., 2001).

3.7. Çalışmada Kullanılan Antibiyotiklerin MİK Noktalarının Belirlenmesi

Çalışmada Amoksisilin, Klavulanik asit, Ampisilin, Sulbaktam, Epikateşin gallat, Epikateşin, Kateşin hidrat ve Kateşin gallat kontrol grubu olarak da antibiyotik içermeyen kültür ilaveli kuyucuklar kıyaslandı. MİK, kültürlerin mikrodilüsyon kuyucuklarında üremeyi tamamen inhibe eden ve çıplak gözle belirlenebilen büyümenin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonları olarak belirlendi (Demirci ve ark., 2002).

Test sırasında uygulanan antibiyotik ve çay polifenollerinin konsantrasyonları Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. *S. aureus* ve *E.coli* için kullanılan antibiyotik konsantrasyonları (µg/mL).

Kullanılan antibiyotik maddeler	<i>S. aureus</i> için uygulanan konsantrasyonlar	<i>E.coli</i> için uygulanan konsantrasyonlar
Amoksisilin	0.06-0.125-0.25-0.5-1 µg/mL	0.5-1-2-4-8 µg/mL
Amoksisilin+Klavulanat	0.06-0.125-0.25-0.5-1 µg/mL	0.5-1-2-4-8 µg/mL
Ampisilin	0.5-1-2-4-8 µg/mL	1-2-4-8-16 µg/mL
Ampisilin + Sulbaktam	0.5-1-2-4-8 µg/mL	1-2-4-8-16 µg/mL

Tablo 3.3. *S.aureus*'da kullanılan çay polifenolleri ile antibiyotik konsantrasyonlarının MİK değerlerinin eşleştirilmesi (µg/mL).

Epikateşin, Epikateşin gallat, kateşin, kateşin gallat konsantrasyonları (µg/mL)	Amoksisilin konsantrasyon karşılığı (µg/mL)	Ampisilin konsantrasyonu karşılığı (µg/mL)
3.125 µg/mL	0.06 µg/mL	0.5 µg/mL
6.25 µg/mL	0.125 µg/mL	1 µg/mL
12.5 µg/mL	0.25 µg/mL	2 µg/mL
25 µg/mL	0.5 µg/mL	4 µg/mL
50 µg/mL	1 µg/mL	8 µg/mL

Tablo 3.4. *E.coli*'de kullanılan çay polifenolleri ile antibiyotik konsantrasyonlarının MİK değerlerinin eşleştirilmesi (µg/mL).

Epikateşin, Epikateşin gallat, kateşin, kateşin gallat konsantrasyonları (µg/mL)	Amoksisilin konsantrasyonu karşılığı (µg/mL)	Ampisilin konsantrasyonu karşılığı (µg/mL)
3.125 µg/mL	0.5 µg/mL	1 µg/mL
6.25 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL
12.5 µg/mL	2 µg/mL	4 µg/mL
25 µg/mL	4 µg/mL	8 µg/mL
50 µg/mL	8 µg/mL	16 µg/mL

4. BULGULAR

4.1. Elde Edilen Bulgular

İnoküle edilmiş mikroplaklar 35 ± 2 °C ' de 18–20 saat aerobik koşullarda inkübasyon sonrası plaklarda gelişen üreme veya üreme durumları, çıplak göz ile değerlendirilmiştir. Seri dilüsyon skalalarında bulanıklığın kaybolduğu, yani üremenin gerçekleşmemiş olduğu konsantrasyona denk gelen kuyucuklar, o suşlar için MİK değerleri olarak kabul edilmiştir. Kontrol grubu olarak antibiyotik içermeyen kuyucukların hepsinde bulanıklıklar gözlenerek üremeler kaydedilmiştir.

E.coli'nin ampisilin, ampisilin+sulbaktam ve çay polifenollerini ile ilgili MİK sonuç değerleri Tablo 4.1.' de, amoksisilin, amoksisilin+klavulanat ve çay polifenollerini ile ilgili MİK sonuç değerleri de Tablo 4.2.' da gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Ampisilin, ampisilin+sulbaktam ile çay polifenollerininin *E.coli* deney grupları üzerindeki MİK (mcg/ml) değerleri

<i>E.coli</i>	Ampisilin	Ampisilin + sulbaktam	Ampisilin + Epikateşin	Ampisilin + Epikateşin Gallat	Ampisilin + Kateşin	Ampisilin + Kateşin Gallat
X ₁	8	8	8	8	8	8
X ₂	16	4	8	8	16	16
X ₃	16	8	16	16	16	16
X ₄	16	8	16	16	16	16
X ₅	8	4	16	16	16	16
X ₆	16	8	16	16	16	16
X ₇	8	8	16	16	16	16
X ₈	16	8	16	16	16	16

Tablo 4.2. Amoksisilin, amoksisilin+klavulanat ile çay polifenollerinin *E.coli* deney grupları üzerindeki MİK (mcg/ml) değerleri

<i>E.coli</i>	Amoksisilin	Amoksisilin + Klavulanat	Amoksisilin + Epikateşin	Amoksisilin + Epikateşin Gallat	Amoksisilin + Kateşin	Amoksisilin + Kateşin Gallat
X ₁	2	1	1	1	1	2
X ₂	2	1	1	1	1	2
X ₃	2	1	1	1	1	2
X ₄	2	2	1	1	2	2
X ₅	2	2	1	1	2	2
X ₆	2	1	1	2	2	2
X ₇	2	2	1	2	2	2
X ₈	2	1	1	1	2	1

S. aureus'un ampisilin, ampisilin+sulbaktam ve çay polifenolleri ile ilgili MİK sonuç değerleri Tablo 4.3.' de, amoksisilin, amoksisilin+klavulanat ve çay polifenolleri ile ilgili MİK sonuç değerleri de Tablo 4.4.' da gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Ampisilin, ampisilin+sulbaktam ile çay polifenollerinin *S.aureus* deney grupları üzerindeki MİK (mcg/ml) değerleri

<i>S. aureus</i>	Ampisilin	Ampisilin + sulbaktam	Ampisilin + Epikateşin	Ampisilin + Epikateşin Gallat	Ampisilin + Kateşin	Ampisilin + Kateşin Gallat
X ₁	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5
X ₂	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5
X ₃	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5
X ₄	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5
X ₅	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5
X ₆	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5
X ₇	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5
X ₈	1	0.50	0.5	1	0.5	1

Tablo 4.4. Amoksisilin, amoksisilin+klavulanat ile çay polifenollerinin *S.aureus* deney grupları üzerindeki MİK (mcg/ml) değerleri

<i>S. aureus</i>	Amoksisilin	Amoksisilin + Klavulanat	Amoksisilin + Epikateşin	Amoksisilin + Epikateşin Gallat	Amoksisilin + Kateşin	Amoksisilin + Kateşin Gallat
X ₁	1	0.06	0.06	0.25	0.5	0.25
X ₂	1	0.12	0.06	0.25	1	0.25
X ₃	1	0.06	0.12	0.12	1	0.25
X ₄	1	0.06	0.06	0.12	1	0.25
X ₅	1	0.06	0.06	0.25	1	0.25
X ₆	1	0.12	0.06	0.12	1	0.25
X ₇	1	0.06	0.12	0.12	0.5	0.25
X ₈	1	0.12	0.12	0.25	0.5	0.25

4.2. İstatistiksel Değerlendirmeler

Hesaplamalarda elde edilen ölçümlere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama \pm SD olarak aşağıdaki tablolarda verilmiştir. Oluşturulan ampisilin ve amoksisilin gruplarının karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis varyans analizi ve farklı grupların belirlenmesinde parametrik olmayan post hoc testlerden Tukey testi kullanılmıştır. İstatistik anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

4.2.1. *E.coli* için ampisilin ve çay polifenol gruplarının karşılaştırılması

Ampisilin gruplarına göre ortalama ve standart sapma değerleri aşağıdaki tablo 4.5.' da verilmiştir.

Tablo 4.5. *E. coli* için ampisilin gruplarının karşılaştırılması

<i>E.coli</i>	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Ampisilin	8	13.0000	4.14039	1.46385	8.00	16.00
Ampisilin+ sulbaktam	8	7.0000	1.85164	.65465	4.00	8.00
Ampisilin + Epikateşin	8	14.0000	3.70328	1.30931	8.00	16.00
Ampisilin + Epikateşin gallat	8	14.0000	3.70328	1.30931	8.00	16.00
Ampisilin + Kateşin	8	15.0000	2.82843	1.00000	8.00	16.00
Ampisilin + Kateşin gallat	8	15.0000	2.82843	1.00000	8.00	16.00
Total	48	13.0000	4.16674	.60142	4.00	16.00

Yapılan istatistik çalışmalarda aşağıdaki gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur (P<0.05);

Ampisilin sulbaktam ile ampisilin arasındaki farkın (P=0.008),

Ampisilin sulbaktam ile ampisilin + epikateşin arasındaki farkın (P=0.001),

Ampisilin sulbaktam ile ampisilin + epikateşin gallat arasındaki farkın (P=0.001),

Ampisilin sulbaktam ile ampisilin + kateşin arasındaki farkın (P=0.0001),

Ampisilin sulbaktam ile ampisilin + kateşin gallat arasındaki farkın (P=0.0001) istatistik olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

4.2.2. *E.coli* için amoksisilin ve çay polifenol gruplarının karşılaştırılması

Amoksisilin gruplarına göre ortalama ve standart sapma değerleri aşağıdaki tablo 4.6.' da verilmiştir.

Tablo 4.6. *E. coli* için amoksisilin gruplarının karşılaştırılması

<i>E.coli</i>	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Amoksisilin	8	2.0000	.00000	.00000	2.00	2.00
Amoksisilin + klavulanat	8	1.3750	.51755	.18298	1.00	2.00
Amoksisilin + Epikateşin	8	1.0000	.00000	.00000	1.00	1.00
Amoksisilin + Epikateşin gallat	8	1.2500	.46291	.16366	1.00	2.00
Amoksisilin + Kateşin	8	1.6250	.51755	.18298	1.00	2.00
Amoksisilin + Kateşin gallat	8	1.8750	.35355	.12500	1.00	2.00
Total	48	1.5208	.50485	.07287	1.00	2.00

Yapılan istatistik çalışmalarda aşağıdaki gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur (P<0.05);

Amoksisilin ile amoksisilin + klavulanat arasındaki farkın (P=0.024),

Amoksisilin ile amoksisilin + epikateşin arasındaki farkın (P=0.0001),

Amoksisilin ile amoksisilin + epikateşin gallat arasındaki farkın (P=0.004),

istatistik olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Bunların dışında kalan gruplardan;

Amoksisilin ile Amoksisilin + kateşin ve amoksisilin ile amoksisilin + kateşin galat arasındaki grup farklarının ise anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

4.2.3. *S.aureus* için ampisilin ve çay polifenol gruplarının karşılaştırılması

Ampisilin gruplarına göre ortalama ve standart sapma değerleri aşağıdaki tablo 4.7.' da verilmiştir.

Tablo 4.7. *S.aureus* için ampisilin gruplarının karşılaştırılması

<i>S.aureus</i>	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Ampisilin	8	.5625	.17678	.06250	.50	1.00
Ampisilin+ sulbaktam	8	.2813	.08839	.03125	.25	.50
Ampisilin + Epikateşin	8	.2500	.00000	.00000	.25	.25
Ampisilin + Epikateşin gallat	8	.5625	.17678	.06250	.50	1.00
Ampisilin + Kateşin	8	.3750	.13363	.04725	.25	.50
Ampisilin + Kateşin gallat	8	.5625	.17678	.06250	.50	1.00
Total	48	.4323	.19116	.02759	.25	1.00

Yapılan istatistik çalışmalarda aşağıdaki gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($P<0.05$);

Ampisilin ile ampisilin sulbaktam arasındaki farkın ($P=0.003$),

Ampisilin ile ampisilin + epikateşin arasındaki farkın ($P=0.001$),

Ampisilin sulbaktam ile ampisilin + epikateşin gallat arasındaki farkın ($P=0.003$),

Ampisilin sulbaktam ile ampisilin + kateşin gallat arasındaki farkın ($P=0.003$),

istatistik olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Bunun dışında kalan ampisilin sulbaktam ile ampisilin + kateşin arasında anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir.

4.2.4. *S. aureus* için amoksisilin ve çay polifenol gruplarının karşılaştırılması

Amoksisilin gruplarına göre ortalama ve standart sapma değerleri aşağıdaki tablo 4.8.' da verilmiştir.

Tablo 4.8. *S.aureus* için amoksisilin gruplarının karşılaştırılması

<i>S.aureus</i>	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Amoksisilin	8	1.0000	.00000	.00000	1.00	1.00
Amoksisilin + klavulanat	8	.0825	.03105	.01098	.06	.12
Amoksisilin + Epikateşin	8	.0825	.03105	.01098	.06	.12
Amoksisilin + Epikateşin gallat	8	.1850	.06949	.02457	.12	.25
Amoksisilin + Kateşin	8	.8125	.25877	.09149	.50	1.00
Amoksisilin + Kateşin gallat	8	.2500	.00000	.00000	.25	.25
Total	48	.4021	.38371	.05538	.06	1.00

Yapılan istatistik çalışmalarda aşağıdaki gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($P<0.05$);

Amoksisilin ile amoksisilin + klavulanat arasındaki farkın ($P=0.0001$),
Amoksisilin ile amoksisilin + epikateşin arasındaki farkın ($P=0.0001$),
Amoksisilin ile amoksisilin + epikateşin gallat arasındaki farkın ($P=0.0001$),
Amoksisilin ile amoksisilin + kateşin arasındaki farkın ($P=0.018$),
Amoksisilin ile amoksisilin + kateşin gallat arasındaki farkın ($P=0.0001$),
olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Antibiyotiklere karşı bakterilerin dirençleri ciddi problemler oluşturmaktadır. MRSA infeksiyonları, özellikle sonuçlandırılmayan hastane infeksiyonları şeklinde bulaşan kişilerde ve hastalara bakanlarda sıklıkla görülmektedir (Herolds ve ark., 1998). Yeni tedavi yollarının araştırılması bir sağlık önceliği olmuştur (Taylor ve ark., 2002).

Çeşitli örneklerden soyutlanan 198 *E.coli* kökeninde %93,4 oranında ampisiline dirençli olduğunu saptamışlardır (Tokbaş ve ark., 1987). Yine 1987 yılında Yüce ve ark. idrar dışkı örneklerinden izole ettikleri 100 *E.coli* kökeninde ampisiline % 60 oranında dirençli olduğunu bildirmişlerdir (Yüce ve ark., 1988a). 1988 yılında Coşar, idrar yolu infeksiyonuna neden olan 130 *E.coli* kökeninde % 71 oranında ampisilin direnci saptamışlardır (Coşar, 1988).

ABD’nde 1973 yılında *E.coli*’ de % 23 oranında ampisilin direnci görülüyor iken, 1983’te bu oranın %31’e yükseldiği belirlenmiştir (Atkinson, 1986).

Medeiros ve ark., 1984 yılında Fransa’da *E.coli* kökenlerinde % 25 oranında beta-laktamazlara bağlı ampisilin direnci saptamışlardır (Acar ve ark. 1988). 1987’ de O’Brien ve ark., toplumda edinilmiş infeksiyonlarda etken olan *E.coli* kökenlerinde % 15-30, hastane infeksiyonlarında etken olan kökenlerinde ise % 40-60 oranında beta-laktamaz aktivitesi bulduklarını bildirmişlerdir (Acar ve ark., 1989).

2007 yılında Asya Pasifik bölgesinde yapılan bir araştırmada, intra-abdominal infeksiyonlardan izole edilen Gram negatif basillerden % 42,2 oranında geniş spektrumlu beta-laktamaz üreten suşlar elde edilmiştir. Ayrıca Hindistanda geniş spektrumlu beta-laktamaz üreten *E.coli* oranı %79, Çin’de %55, Tayland’da %50.8 olarak bulunmuştur (Hawser ve ark., 2009).

Ampisilin ile beta-laktamaz inhibitörü içeren kombinasyonlar kullanımı sonucunda *E.coli* kökenlerinde görülen duyarlılık artışı, Tokbaş ve ark., tarafından %62, Yüce ve ark. tarafından % 41 olarak bildirilmiştir (Williams ve ark., 1974; Tokbaş, 1981). Bu bulgular da *E.coli*’deki ampisilin direncinin, büyük oranda beta-laktamaz kaynaklı olduğunu göstermektedir.

Beta-laktamaz inhibitörleri (klavulanat, sulbatam ve tazobaktam) ile beta-laktam antibiyotiklerinin, beta-laktamaz üreten bakteriler ile sonuçlanan infeksiyonların üstesinden gelinmesinde başarılı bir yöntem olmaktadır (Maddux, 1991). Bakteriyel dirençlere karşı en güvenilir yöntem olarak beta-laktam antibiyotiği olan amoksisilin ile beta-laktamaz inhibitörü olan klavulanik asitin kombinasyonları kullanılmaktadır (Yam ve ark., 1998; Zhao ve ark., 2001; Stapleton ve ark., 2002).

Ampisilin çok başarılı bir antibiyotik olmasına rağmen MRSA'ların çoğu ve bazı MSSA'lar beta-laktamaz üreterek bu antibiyotiğin aktivitesini bozmaktadırlar. Sulbaktam beta-laktamaz enzimini geri dönüşümsüz olarak baskılar. Ampisilin/sulbaktam kombinasyonu beta-laktamazı baskılayarak aktivitesini arttırmaktadır. Önceki çalışmalarda bu kombinasyonların beta-laktamaz üreten suşlara (MRSA gibi) yeterli derecede etkili olmadığı gösterilmiştir (Bary ve ark., 1990; Backo ve ark., 1999).

İnfeksiyonların pek çoğunda amoksisilin/klavulanatlı kombinasyonlar kullanılmasından dolayı son zamanlarda bakteri suşlarının inhibitör enzimleri geliştirerek direnç oluşturması çok sık görülmeye başlamıştır (Vedel ve ark., 1992; Blasquez ve ark., 1993; Chaibi ve ark., 1999).

Yine bu konu ile ilgili Amerika'nın Mephis eyaletinde bulunan çocuk araştırma hastanesinde yapılan bir çalışmada, *S.aureus*' un amoksisilin-klavulanata %83,9–100, seftriaksona ise %98,7–100 arasında değişen yüksek oranlarda direnci saptanmıştır (Waldvogel, 1995).

1993 yılında altı aylık dönemde Fransız araştırma hastanesinde yapılan çalışmada üriner infeksiyonundan hastalardan izole edilen 2972 *E.coli* suşlarının % 25'i, toplumdan izole edilen suşların %10'u amoksisilin/klavulanat kombinasyonlarına dirençli oldukları tespit edilmiştir (Henquell ve ark., 1994).

Burun ve boğaz kültürlerinden izole edilen stafilokoklar ile yapılan bir çalışmada klinik izolatlardan ampisiline dirençli *S.aureus* %71 olarak tespit edilmiştir (Gülşen, 2002).

2007 yılında Hacettepe Üniversitesinde yapılan çok merkezli gözetim çalışmalarında klinik izolatlardan alınan *E.coli* suşlarının %42 oranında cefperazon/sulbaktama dirençli oldukları bulunmuştur (Gür ve ark., 2009).

Yine benzer bir çalışmada hastane çevresinden alınan klinik örneklerden elde edilen *S. aureus* suşlarının çoklu antibiyotik dirençleri araştırıldığında amoksisilin/klavulanat kombinasyonuna karşı %71.3 oranında direnç saptanmıştır (Çetinkol ve ark., 2008).

Bu nedenlerden dolayı yeni antibiyotiklere ya da farklı yaklaşımlara acil ihtiyaç duyulmaktadır. Doğal ürünler ve alışıl gelmiş ilaçlar yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine katkıda bulunabilirler. Bu nedenle beta-laktamaz ile beta-laktam antibiyotiklerinin inaktivasyonunu engelleyecek yeni stratejilerin ileride çok önemli olacağını düşünmekteyiz.

Camellia sinensis dünyada popüler bir şekilde tüketilmektedir. Çin tıbbında çay, modern konseptlerde çeşitli infeksiyonların tedavisinde, idrar söktürücü, ateş düşürücü olarak kullanılmaktadır. 1989'a kadar Hamilton-Miller tarafından gözden geçirilene kadar çayın antimikrobiyal etkilerinin kanıtları oldukça sınırlı idi (Hamilton ve ark., 1995; 1997). Yapılan çalışmalarda çay kateşinlerinden EGCG'ın başlıca antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olduğunu bulmuşlardır. Yine EGCG'ın ve diğer çay polifenollerinin MSSA (metisilin duyarlı *S.aureus*) ve MRSA'ya karşı bakterisidal etkisi gösterilmiştir (Toda ve ark., 1989; Ikigai ve ark., 1993; Nakayama ve ark., 1993). Yapılan çalışmalarda örnek olarak alınan klinik izolatların tümünün test sonuçlarında MRSA'nın beta-laktamlara karşı dirençlerinde EGCG kullanımı ile MİK değerlerinin ¼ oranında azaldığı kanıtlanmıştır (Takahashi ve ark., 1995).

Polifenolik bileşikler olan epikateşin gallat ve epigallokateşin gallatlar Japon yeşil çayının(*Camellia sinensis*) başlıca bileşenlerindedir. Bu maddelerin, beta-laktam antibiyotiklerine dirençli MRSA'ya karşı etkili oldukları gösterilmiştir (Zao ve ark., 2001; Stapleton ve ark., 2002).

Benzer çalışmalar olarak, MRSA'ya karşı gallat ve kateşinlerin aktiviteleri araştırıldığında ECG'nin EGCG'den çok daha fazla kapasitede beta-laktam direncini değiştirdiği bulunmuştur. Örnek olarak oksasilin ile yapılan çalışmalarda ECG'daki gallat molekülünün oksasisiline karşı direnç değişimi için çok önemli olduğu, bunun yanında gallik asit ve alkali galattın değişim aktivitesine sahip olmadığı bulunmuştur (Stapleton ve ark., 2004). Bu durumdan yola çıkarak çalışmalarımızda gallat grubu taşıyan ve gallat taşımayan kateşin hidratları kullanarak aynı bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkilerini inceledik. Gallat içeren grupların (ECG ve CG), hem

amoksisilin hem de ampisilin ile kombinasyonlarının *E.coli* ve *S.aureus* dirençli suşlarının MİK değerlerini düşürdüğünü bulduk.

Önceki çalışmaların çoğu, kateşinlerin MRSA'ya karşı aktivitelerinin araştırmalarında EGCG 'ın üzerine yoğunlaşmıştır. Fakat yapılan diğer iki çalışmalarda ECG'ın beta-laktam direnç değişim aktivitesinin EGCG' dan daha fazla olduğu ispatlanmıştır (Shiota, 1999; Hamilton-Miller ve ark., 2000). Kateşin galat'ın direnç değişim aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. EGCG ve ECG arasındaki değişim aktivitesindeki farklılık çeşitli klinik MRSA izolatlarına karşı oksasilin ile çay polifenollerinin kombinasyonlarının aktiviteleri ile gösterilmiştir. ECG' lı kombinasyonlar etkili iken, EGCG'lı kombinasyonlarda herhangi bir etki görülmemiştir (Stapleton ve ark., 2004).

Bu nedenle bizim çalışmalarımızda da EGCG yerine ECG ve diğer çay polifenollerini araştırılmıştır.

Beta-laktamlardaki direnç değişimine sebep olan kateşin gallatın mekanizması tam olarak açık değildir. Buna rağmen bazı kanıtlar EGCG'nin peptidoglikana bağlanarak ve hücre duvarı yapısına karışarak beta-laktam duyarlılığına neden olduğunu göstermektedir (Zhao ve ark., 2001).

Zhao tarafından EGCG' nin etkisinin peptidoglikana direkt bağlanarak gerçekleştirdiğini ileri sürmüştür (Zhao ve ark., 2001).

Beta-laktamlarla ilgili yapılan diğer bir araştırmada; EGCG' ın peptidoglikan tabakasına direkt bağlanarak bakteri hücre duvarının bütünlüğünü ve biyosentezini engelleyerek MRSA'ya karşı beta-laktam aktivitelerini arttırdığı kanıtlanmıştır. Yine laboratuvar ortamlarda penisilinaz üreten *S .aureus*'a karşı EGCG' nin penisilinazı etkisiz bırakarak ampisilin ve penisilin aktivitesini koruduğu görülmüştür (Zhao ve ark., 2001). Oksasilin ile EGCG arasında yapılan çalışmalarda da *S.aureus*' un peptidoglikanına bağlanarak sinerjik etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Zhao ve ark., 2001).

Kateşinlerin etki mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda; kateşinlerin nanomol konsantrasyonlarının fosfolipit palisatlarını bölmesi ile membran yapı ve fonksiyonundaki değişikliklere sebep oldukları gösterilmiştir (Hashimoto, 1999). Benzer bir çalışma olarak da gallat molekülü taşıyan kateşinler, gallat taşımayan kateşinlere oranla membran yapısında bulunan fosfotidilkolin ve fosfotidiletanolamin

bağlarının daha derin tabakalarına bağlanarak membran modelinin yapı ve fonksiyonunu değiştirdiğini göstermişler. ECG' nin ise diğer kateşinler olan EGCG, EC ve EGC'nin bağlandığı fosfolipit-su birimlerinden daha derinlere bağlanabildiklerini göstermişlerdir (Caturla ve ark., 2003).

Gram negatif bakterilerin peptidoglikan tabakası (1-2 katman), Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakasına (30-50 katman) oranla daha azdır. Bununla beraber Gram negatiflerin dış membranın büyük bir bölümü LPS (lipopolisakkaritler) ile kaplıdır. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin bu yapısal farklılıkları ve LPS ile EGCG arasındaki düşük afiniteden dolayı EGCG ile beta-laktam kombinasyonları arasındaki duyarlılıkların farkına neden olduğu düşünülmektedir (Zhao ve ark., 2001).

Biz EC, EGC, CG gruplarında ampicilin antibiyotiği üzerindeki yapmış olduğumuz çalışmalarda Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerinin her ikisinde de sinerjik bir etki olduğunu gördük.

Hu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada EGCG'nin düşük konsantrasyonlarında MRSA'nın beta-laktamlara karşı direnç etkilerini geri döndürdüklerini bulmuşlardır (Takahashi ve ark., 1995; Hu ve ark., 2001; Zhao ve ark., 2001; Hu ve ark., 2002b).

ECG, EGCG ve CG gibi gallokteşinlerin orta seviyedeki konsantrasyonları (6.25-25µg/ml), yüksek seviyedeki (>256µg/ml) direnci düşük seviyelerdeki kırılma noktasına düşürerek beta-laktam MİK değerini azaltmışlardır (Zhao ve ark., 2001; Stapleton ve ark.,2004). Epikateşin ve epigallo kateşin gibi gallat içermeyen kateşinlerde bu etki görülmemiştir (Stapleton ve ark.,2004).

Biz de yapmış olduğumuz çalışmada çay polifenollerinin aynı konsantrasyonlarını (3.125-6.25-12.5-25-50 µg/ mL) uyguladık. Elde ettiğimiz sonuçlarda bu konsantrasyonların MİK değerlerini azaltmaya yeterli olduğunu gördük.

Önceki çalışmalarda gallat grubunun epikateşin gallatın aktivitesi için temel ve gerekli olduğu görülmüştür (Stapleton ve ark., 2004). Bu aktivite bakteriyel esterazlarla potansiyel olarak kırılabilen ester zinciri ile kateşin parçalarının bağlanması olarak görülmektedir (Kohri ve ark, 2001). Bununla beraber gallat gruptan yoksun EC ve EGC esteraz inhibitörü gibi rol oynarlar. *S. aureus*'a karşı

ECG'nin kararlı esteraz bağları oksasilin ile beraber kullanıldığında benzer etkiler görülmüştür (Anderson ve ark., 2005).

Biz de çalışmamızda *E.coli* ve *S. aureus* üzerinde yapılan deneylerde ECG'nin tüm deney gruplarında ampisilin ve amoksisilin ile birlikte sinerjik olarak etkili olduklarını bulduk.

Yapısal bitki polifenollerinden EGCG'nin de içinde yer aldığı kateşinler eskiden beri incelenmektedir. Çay kateşinleri olan; epikateşin gallat (ECG) ve epigallokateşin gallat (EGCG)' ların çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı bakterisidal oldukları gösterilmiştir (Hu ve ark., 2002a).

Daha önce çalışılan hücre duvarı sentezi inhibitörü vankomisin MRSA tedavisi için öncelikli bir seçim olduğu düşünülerek vankomisin ile EGCG arasındaki etkileşim araştırılmıştır. Polifenollerin glikopeptit antibiyotiklerin peptit yapılarına bağlanmasından dolayı vankomisin ve teikoplaninin aktivitelerini engellediği görülmüştür (Hu ve ark., 2002a). EGCG ' nin > 50 mg/L konsantrasyonları et suyundaki proteinleri çöktürür. Bu da polipeptit ya da glikopeptit ile EGCG' nin direkt bağlanarak antagonist etki yaptığını göstermiştir (Hu ve ark., 2002a).

E.coli üzerinde yapılan çalışmada, ampisilin ile EGCG arasındaki bir sinerji bulunamamıştır (Hu ve ark., 2002a). Bizim yaptığımız çalışmalarda ise *E.coli* üzerinde yapılan testlerde ampisilin ile çay polifenollerinin (ECG, EC, CG ve kateşinin) tümünde sinerjik olarak anlamlı bir etki bulunmuştur. *E.coli* üzerinde amoksisilin ile çay polifenollerini arasında yaptığımız çalışmada ise sadece EC ve ECG maddelerinde sinerjik olarak anlamlı bir etki bulunurken, kateşin ve CG maddelerinde sinerjik olarak bir etki bulunmamıştır.

6. SONUÇ

İnfeksiyonların tedavilerinde beta-laktam antibiyotikleri ile beta-laktamaz kombinasyonlarının kullanımı beta-laktamaz üreten bakterilerin sebep olduğu infeksiyonların üstesinden gelinmesinde başarılı bir yöntemdir. Fakat beta-laktamazların çok sık kullanımı sonucu bakterilerin direnç gelişimi kaçınılmazdır. Son zamanlarda Dünyada ve Türkiyede yapılan çalışmalarda bakterilerin direnç gelişimi çok sık olarak ortaya çıkmaktadır

Bakterilerin beta-laktamlara karşı gerek enzim üretme yolu ile gerekse yapılarını değiştirerek devamlı direnç mekanizmaları oluşturmaları kaçınılmazdır. Bu nedenle beta-laktam antibiyotiklerin inaktivasyonunu engelleyecek, klinikte kullanımı olası yeni beta-laktamaz enzim inhibitörleri araştırılması özellikle önemli olacaktır.

Çayın düşük toksisitesi nedeniyle yüzyıllardır milyonlarca insan tarafından çok fazla miktarda tüketilmektedir. Çay polifenollerinin, beta-laktam antibiyotikler ile birlikte beta-laktamaz inhibitörü olarak kullanılması için birçok çalışma yapılmıştır. Önceden yapılan çalışmalar ve alınan sonuçlar ışığında in vitro ortamlardaki testlerde çay polifenollerinin beta-laktamlarla birlikte kullanıldığında antibiyotiklerin etkilerini arttırdıkları saptanmıştır.

Biz de araştırmamızda; *E.coli* ve *S.aureus*' un dirençli suşlarında EC ve ECG'nin ampisilin ve amoksisilinle beraber sinerjik etkilerini, CG'ın ampisilin ile beraber *E.coli* ve *S.aureus*' a sinerjik etkilerini bulduk.

İleride çay polifenollerinin daha kapsamlı bir şekilde antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olduğunu gösteren çalışmalar yapılacağını düşünmekteyiz. Bu çalışmaların in vitro ortamlar yanında, in vivo ortamlarda da çay polifenollerinin klinik kullanımındaki deneme çalışmalarını araştırmaya değer bir konu olarak bulmaktayız.

7. KAYNAKLAR

1. **Acar JF, Minozzi C.** Problems and changing patterns of resistance with gram negative bacteria. *Rev Infect Dis.* **1985**; 7(supply 4): 51–545.
2. **Acar JF, Minozzi C.** Role of beta-lactamases in the resistance of gram negative bacilli to beta-lactam antibiotics. *Rev Infect Dis.* **1986**; 8(suppl 5): 86–482.
3. **Acar JF, Gutmann L, Kitsiz MD.** Beta-lactamases in clinical isolates spektrum implications of sulbactam/ampicillin drugs. **1988**; 35(supply 7): 2–8.
4. **Acar JF, Kitsiz MD, Gutmann L.** The incidence of beta-lactamase producing pathogens. *Apimis.* **1989**;5: 2–8.
5. **Amyes SGB, Gemmel CG.** Antibiotic resistance in bacteria, *J.Med. Microbiol.* **1992**; 36: 4–29.
6. **Anderson JC, Headley P, Stapleton D, Taylor PW.** Synthesis and antibacterial activity of a hydrolytically stable (-)-epicatechin gallate analogue for the modulation of β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**; 15; 2633–2635.
7. **Atkinson BA.** Species incidence, trends of susceptibility to antibiotics in the US and other countries: MIC and MBC. In: **Lorian V editor.** *Antibiotics in Laboratory Medicine.* Baltimore: Williams and Wilkins;**1986**: 995–1163.
8. **Backo M, Gaenger E, Burkart A, Chai YL, Bayer AS.** Treatment of experimental staphylococcal endocarditis due to a strain with reduced susceptibility in vitro to vancomycin: efficacy of ampicilline-sulbactam. *Antimicrobial Agents and Chemother.***1999**; 43: 8–2565.
9. **Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM.** Enterobacteriaceae. In: **Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM, editors.** *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.* Bosby: Baltimore.,**1994**: 362-387.
10. **Barry AL, Jones RN.** In vitro activities of ampicilline-sulbactam and cefoperazone-sulbactam against oxacillin-resistant staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemother.***1990**; 34: 2–1830.
11. **Bilgehan H.** Enterobacteriaceae. *Klinik mikrobiyolojik tanı.* İzmir, **2004a**: 425–451.
12. **Bilgehan H.** Gram olumlu koklar. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı.* İzmir: **2004b**; 495–497.
13. **Bilgehan H.** Mikroorganizmaların sınıflandırılmaları ve yapıları. *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi,* İzmir: **2005**; 36–37.
14. **Blasquez J, Baquero MR, Canton I, Alos I, Baquero.** Characterization of new TEM-type β -lactamase resistant to clavulanate, sulbactam and tazobactam. *Antimicrobial Agents and Chemother.***1993**; 37: 2059–2063.
15. **Bush K.** Minireviews characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemother.***1989**; 33(3): 259–264.
16. **Bush K, Jacopy GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemother.***1995**; 39: 1211–1233.

17. **Caturla N, Vera-Samper E, Villalain J, Mateo CR, Micol V.** The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**; 34: 648–662.
18. **Cengiz T.** Staphylococcus. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.*, Ankara **1999**; 339–347.
19. **Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R.** Inhibitor-resistance TEM β -lactamase: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemother.* **1999**; 43: 447–458.
20. Clinical Laboratory Institute. *Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları*; Ankara: Bilimsel tıp yayınevi; Ocak, **2005**, Onbeşinci bilgi eki.
21. **Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R.** The astonishing complexity of antibiotic resistance. *Clinic Microbial In/ect.* **2006**;6(suppl 3):93–94.
22. **Coşar G.** Üropatojen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları, hemoliz ve insan 0 grubu eritrositleri ile hemagglütinasyon özellikleri. *İnfeksiyon Dergisi.* **1988**;2(1): 55–60.
23. **Curtis NAC, Richmond MH, Sykes RB.** Periplasmic Location of Beta-lactamase Specified either by a plasmid or a chromosomal gene in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **1972**;112(3): 34–1433.
24. **Çetinkol Y, Altındış M, Çetinkaya Z, Aktepe OC.** Determination of methicillin resistance in *staphylococci* with different methods and detection of multiple antibiotic resistance. Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye. **2008**; 42(1): 119–124.
25. **Demirci F, Krimer N, Kürkçüoğlu M. ve arkadaşları.** Antimicrobial screening of mentha piperita essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. Eskişehir:* **2002**;50: 3943–3946.
26. **Eraksoy H.** Stafilokoklarda antibiyotik direnci, *Ankem Dergisi.* **1989**; 3(3): 457–463.
27. **Gülay Z.** Antimikrobiyal ilaçlara direnç. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: **1999**;93–94.
28. **Gülay Z.** Gram olumsuz bakterilerdeki direncin moleküler temelleri. İzmir: Güven kitabevi; **2003**: 87–93.
29. **Gülşen S,** Burun ve boğazdan elde edilen stafilokokların çeşitli fenotipik özelliklerinin antibiyotik dirençlilikleri ile korelasyonu. Gazi üniversitesi Fen Bilimleri Ens. Ankara, **2002**; **44–46.**
30. **Gür D,** Antibiyotiklere direnç gelişmesi. **Akalın H.** Editör. *Klinik Uygulamada Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar.* Ankara: Güneş Kitabevi; **1994**: 19–37.
31. **Gür D,** Antibiyotiklere direnç gelişmesi. *Antimikrobial Tedavi Bülteni.* **2000**; 4: 49–52.
32. **Gür D, Haşçelik G, Aydın N, Gültekin M, Ogünç D, Arıkan OA, Uysal S, Yaman A, Kibar F, Gülay Z, Sümerkan B, Esel D, Kayacan CB, Aktaş Z, Söyletir G, Altınkanat G, Durupınar B, Darka O, Akgün Y, Yayla B, Gedikoğlu S, Sımrtaş M, Yaman G.** Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. Hacettepe University School of Medicine, clinical microbiology laboratory, Ankara, Turkey. **2009**; 21(4): 383–389.

33. **Hamilton-Miller JMT.** Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.) *Antimicrob Agents Chemother.* **1995**; 39: 2375–2377.
34. **Hamilton-Miller JMT.** Microbiological properties of tea infusions. In **Clifford MN, Schubert R, Spiro M. editors.** Chemical and biological properties of tea infusion. Frankfurt, Germany. **1997**; 63–75.
35. **Hamilton-Miller JMT, Shah S.** Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob Chemother* **2000**; 46: 847–863.
36. **Hashimoto T, Kumazawa S, Nanjo F, Hara Y, Nakayam T.** Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**; 63: 2252–2255.
37. **Hawser SP, Bounhillon SK, Hoban DJ, Badal RE, Hsueh PR, Paterson DL.** Emergence of high levels of extended-spectrum beta-lactamase producing gram negative bacilli in the Asia Pacific region: data from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) program, 2007. *Antimicrobial Agents Chemother.* **2009**; 53(8); 3280–3284.
38. **Herolds BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderl DS, Gaskin RE, Boyle VS,** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *Journal of the American Medical Association.* **1998**; 8–593.
39. **Hoepfich PD.** Antimicrobics and anthelmintics for systemic therapy. *Infectious Diseases* 4th. Ed. Philadelphia: J.B.Lippincott company; **1990**: 39–235.
40. **Hu ZQ, Zhao WH, Hara Y, and Shimamura T.** Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin by nongalloylated catechins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* Tokyo: Japan; **2001**: 48; 361–364.
41. **Hu ZQ, Zhao WH, Yoda Y, Asano N, Hara Y, and Shimamura T.** Additive, indifferent and antagonistic effects in combinations of epigallocatechin gallate with 12 non- β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* Tokyo: Japan. **2002a**: **46**; 1051–1054.
42. **Hu ZQ, Zhao WH, Asano N, Yoda Y, Hara Y, and Shimamura T.** Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **2002b**: **46**; 558–560.
43. **Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T.** Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim. Biophys.* **1993**; 1147:132–136.
44. **Kohri T, Matsumoto N, Yamakawa M, Suzuki M, Nanjo F, Hara Y, Oku N.** Metabolic fate of (-)-[4-³H]epigallocatechin gallate in rats after oral administration. *J. Agric. Food Chem.* **2001**; 49: 4102–4112.
45. **Komatsu M, Aihara M, Shimakawa K, Iwasaki M, Nagasaka Y, Fuduka S, Matsuo S, Iwatani Y.** Evaluation of microscan ESBL confirmation panel for Enterobacteriaceae producing, extended-spectrum β -lactamases isolated in Japan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* **2003**; 46: 125–130.
46. **Laden SK, Hamilton CW, Romankeewicz JA, Acar JF.** Overview of antimicrobial agent resistance. Beta-lactamase inhibition: pharmacology, antimicrobial activity and pharmacokinetics. In: **Acar JF. editor.** New Jersey: Advanced Therapeutics Communications Inc. **1985**; 7–11.

47. **Livermore DM.** Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. *Clinical Microbial Rev.* **1995**;8: 84–557.
48. **Livermore DM.** β -lactamases: quantity and resistance. *Clinical Microbial Rev.* **1997**;3(suppl 4): 9–101.
49. **Livermore DM, Brown DFJ,** Detection of beta-lactamase mediated resistance. *Journal of Antimicrobial Agent and Chemotherapy.* London: **2001**;48: 59–64
50. **Maddux M.** Effects of β -lactamase-mediated antimicrobial resistance: the role of inhibitors. *Pharmacotherapy.* **1991**;(suppl.)11: 40–50.
51. **Madigan MT, Martinko JM, Parker J.** *Biology of Microorganisms.* Prentice Hall international Inc. New Jersey: **1997**.
52. **Mayer KH, Opal SM, Madeiros AA.** Mechanisms of antibiotic resistance. In: **Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE.** editors. *Principles and Practise of Infectious Diseases.* New York: John Wiley and Sons Inc; **1990**: 23–218.
53. **Mediros AA, Whitt DD.** Beta lactases. *Br med Bull.* **1984**;40(1): 18–24.
54. **Muthumani T, Kumar Senthil RS.** Siyah çayda kaliteden sorumlu bileşiklerin gelişimi üzerine fermentasyon zamanının etkisi. UPASI Çay araştırma kuruluğu, çay araştırma enstitüsü. Coimbatore bölgesi, Tamil Nadu Hindistan: **2006**.
55. **Nakayama M, Suzuki K, Toda M, Okuba S, Hara Y, Shimamura T.** Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antivir. Res.* **1993**; 21: 289–299.
56. **Neu HC.** Beta-lactamases a perspective on the contribution of these enzymes to baceterial resistance. *Prostgrad Med*; **1984**; 8 (Sep-Oct suppl): 7–21.
57. **Neu HC.** Contribution of beta-lactamases to bacterial resistance and mechanisms to inhibit beta-lactamases. *Am J. Med.* **1985**;79(suppl 5B): 2–12.
58. **Neu HC.** Antibiotic inactivating enzymes and bacterial and bacterial resistance. In: **Lorian V.** editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine,* Baltimore: Williams and wilkins; **1986**: 81–751.
59. **Owuor PO, Obanda M.** *Food Chemistry.* **1998**; 61: 435–441.
60. **Özgüven V.** Antibakteriyel ilaçlar. Editörler **Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M.** *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* İstanbul: **2008**;195.
61. **Prescott LM, Harley JP, Klein DA.** *Microbiology.* Wm. C. Brown publishers: Iowa, **1993**.
62. **Quintiliani R, Courvalin P.** Mechanism of resistance to antimicrobial agents. In: **Murray pr, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH,** editors. *Manuel of Clinical Microbiology.* American Society for Microbiology, Washington: **1995**:1308–1326.
63. **Ryan KJ.** Enterobacteriaceae In: Ryan K.J. editor. *Scherris Medical Microbiology.* Prentice-Hall International, Montral: **1994**;29–323.
64. **Shiota S, Shimizu M, Mizushima T.** Marked reduction in the minimum inhibitory concentration (MIC) of beta-lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* produced by epicatechin gallate, an ingredient of green tea (*Camellia sinensis*). *Biol Pharm Bull.* **1999**;22: 1388–1390.
65. **Salyers AA, Whitt DD.** Bacterial pathogenesis. In: **Salyers AA, Whitt DD,** editors. *American Society for Microbiology.* Washington: **1994**; 99–110.

66. Stapleton PD, Shah S, Hara Y, Tylor PW. Potential of catechine gallate-mediated sensitization of *Staphylococcus aureus* to oxacillin by nongalloylated catechins. *International Journal of Antimicrobials Agent and Chemotherapy*. Tokyo: **2001**;48: 361–364.
67. Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog*: **2002**; 85: 57–72.
68. Stapleton PD, Shah S, Anderson JC, Hara Y, Hamillton-Miller MT, Tylor PW. Modulation of β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *International Journal of Antimicrobials Agent and Chemotherapy*. Tokyo: **2003**; 462–467.
69. Stapleton PD, Shah S, Anderson JC, Hara Y, Hamillton-Miller MT, Tylor PW. Modulation of β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *International Journal of Antimicrobials Agent and Chemotherapy*. Tokyo: **2004**; 462–467.
70. Sweetman S. Antibacterials. *Martindale The Complete Drug Reference*. 33edition, London-Chicago: **2002**;172–257.
71. Şahin H, Özdemir F. Yeşil çayın sağlık üzerine etkisi. Türkiye 9. gıda kongresi, Bolu:**2006**;219–222.
72. Takahashi O, Cai Z, Toda M, Hara Y, Shimamura T. Appearance of antibacterial activity of oxacillin against methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the presence of catechin. *J.Jpn. Assoc. Infect. Dis*. **1995**;69: 1126–1134.
73. Taylor PW, Stapleton PD, Luzio JP. New ways to treat bacterial infections. *Drug Discov Today*. **2002**;7: 1086–1091.
74. Toda M, Okubo S, Hiyoshi R, Shimamura T. The bactericidal activity of tea and coffee. *Lett. Appl. Microbiol*. **1989**;8: 123–125.
75. Tilton RC, Howard BJ. Antimicrobial susceptibility testing. In: **Howard BJ editor**. *Clinical and Pathogenic Microbiology*. St Louis: The C.V. Mosby company; **1987**: 137–152.
76. Tokbaş A, Tokbaş G, Ulusoy S. Çeşitli bakteriler üzerine sulbaktam/ampisilin kombinasyonunun in vitro etkisinin disk difüzyon yöntemi ile araştırılması. *İnfeksiyon dergisi*.**1987**;1(2–3): 151–155.
77. Tokbaş A. Hastane infeksiyonlarında etken olan bakteriler ve epidemiyolojisi. **Editör, Koşar S**. *Hastane infeksiyonları*. İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası;**1981**;2;7–8. araştırılması.
78. Töreci K. Antibiyotikler ve hastane infeksiyonları. *Ankem Dergisi*. **1991**;5(1)79–88.
79. Vedel G, Belaaouaj A, Lilly G, Labia R, Philippon A, Nevot P, Paul G. Clinical isolates of *Escherichia coli* production TRI β -lactamases: novel TEM-enzymes conferring resistance to β -lactamase inhibitors. *International Journal of Antimicrobials Agent and Chemotherapy*. **1992**; 30: 462–449.
80. Waldvogel FA. *Staphylococcus* (including toxic shock syndrome). In: **Mandell GL, Bennett JE, Dolin D editors**. *Principles and Practise of Infectious Diseases* 4th ed. Churchill Livingstone, New York. **1995**; 1754–1777.
81. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Trends in food science and technology. **2000**;11: 152–160.
82. Williams JD, Cavanagh P. Ampicillin-resistance *Hemophilus influenza meningitis*. *Lancet*.**1974**;1: 864.

- 83. Yam TS, Hamilton-Miller JMT, Shah S.** The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicilline resistance, PBP2' synthesis, and β -lactamase production in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobials Agent and Chemotherapy*. Tokyo: **1998**;42: 6–211.
- 84. Yang CS.** Nutrition. **1999**;15: 946–949.
- 85. Yüce K, Karakartal G, Günhan C, Büke M, Serter D, Ertem E, Hilmi S.** Aminopenisilinlerin tekbaşına ve beta-laktamaz inhibitörleri ile kombinasyonlarının 100 E.coli suşuna in vitro etkileri. *Ege Ü. Tıp Fak. Dergisi*. **1988a**: 27(4);1203–1207.
- 86. Yüce K.** *Antibiyotikler ve infeksiyon hastalıklarında tedavi prensipleri*. İzmir: Bilgehan Basımevi; **1988b**: 8–12.
- 87. Zhao WH, Hu ZQ, Okubo S, Hara Y, Shimamura T.** Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β -lactams against methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobials Agent and Chemotherapy*. **2001**;45: 1737–1742.
- 88. Zhao WH, Hu ZQ, Hara Y, Shimamura T.** Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicilin against penicilinase production *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobials Agent and Chemotherapy*. Tokyo: **2002**;48: 2266–2268.