

T.C.
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

616.01
041
1989
E

STAPHYLOCOCCUS AUREUS 'UN
YENİ AMİNOGLİKOZİTLERDEN
AMİKASİN'E KARŞI
DUYARLILIĞININ DEĞİŞMESİNDE
ADRENALİNİN ETKİSİ

(UZMANLIK TEZİ)

Dr.İMER OKAR

DANIŞMAN:

Prof.Dr.Candan Bozok Johansson

Marmara Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

İstanbul - 1989



Marmara Üniversitesi Kütüphane ve
Dokümantasyon Daire Başkanlığı



T10707

TEŞEKKÜR

Birlikte çalışmaya başladığımızdan bu yana, bütün zorluk ve olanaksızlıklara rağmen, bana bugüne kadar gösterdiği yakın ilgi, destek ve yardımları için kıymetli hocam Sayın Prof.Dr.Candan B. Johansson'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Mikrobiyolojiye başlamama ve sevmeme büyük etkisi olan ve senelerdir manevi desteğini eksik etmeyen değerli hocam Sayın Prof.Dr. Rüknettin Öğütman'a en derin teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında yardımları için arkadaşlarım Biolog Cennet Çelik ve Biolog Serap Kartal'a teşekkür ederim.

Uzmanlık süresi boyunca Anabilim dalında çalışan bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Giriş.....	1
Genel Bilgi.....	3
Gereç ve Yöntem.....	15
Bulgular.....	24
Tartışma.....	27
Özet.....	32
Summary.....	33
Kaynaklar.....	34
Ek Bölüm.....	40

GİRİŞ

Günümüzde çeşitli hastane materyelinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının bazı antibiyotiklere çok dirençli olduğu gözlenmektedir. Bu direnç oluşumu in vivo ve in vitro çalışmalarda farklılık göstermektedir. Nitekim disk diffüzyon yöntemi ile yapılan duyarlılık testleri sonuçları hastaya uygulandığında her zaman beklenen sonuç alınamamaktadır. Duyarlı görünen suşa uygulanan antibiyotik tedavisi sonuç vermediği gibi, tam tersi, in vitro etkisiz gibi görünen bir antibiyotik ile tedavi sağlanabilmektedir. Bunun yanı sıra hastane enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biri olan bu mikroorganizmanın sürekli direnç kazanması tedaviyi zorlaştıran veya sonuçsuz bırakan bir faktördür.

in vivo ve in vitro duyarlılık farklarından yola çıkarak, bu direnç artışında mikroorganizmaların bulunduğu ortamın rolü olduğu düşünülerek in vivo koşulların bir kısmını deney tüpünde sağlamayı planladık. İnsanda kanın çeşitli elementlerinin bu etki farkında rol oynadığı bilinmektedir (1,4,8,23,30). *Staphylococcus aureus*'un direnç oluşturması kanın yapısında bulunan maddelerden, örneğin kanda bulunan çeşitli şekilli elementlerden, hormonlar-

dan, vitaminlerden, fermentlerden, v.b. etkilenmektedir.

Bu deneyi gerçekleştirebilmek için stafilokoklar daha doğal şartlarda (in vivo'ya yakın) üretilmeye çalışılmıştır ve besiyerine adrenalin ve plazma ilave edilmiştir. Amikacin'in Staphylococcus aureus'a karşı etkisi ve bakterinin bu antibiyotiğe duyarlığında bir değişiklik olup olmadığı araştırılmıştır.



GENEL BİLGİLER

EPİNEFRİN VEYA ADRENALİN HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Epinefrin veya adrenalın böbrek üstü bezinin medullasından salgılanır, kromafin granüllerde depolanır, buradan kan dolaşımına geçer ve uzak hedef organlarda hormon görevi yapar.

Genellikle hipoglisemiye cevap olarak serbest kalır ve kan dolaşımına geçer.

Plazma'da normal değeri sırt üstü istirahat halinde iken 8-113 pg/ml, ayakta ise 12-148 pg/ml arasındadır. İdrarla günde ortalama 50 µg atılır. Bu sınırlar cinsiyet ile bağımlı değildir.

Bu miktarlar çeşitli nedenlerle artmaktadır. Örneğin yüksek tansiyonda, nabız hızlanmalarında, streste, heyecanlanmada, enfeksiyonlarda, v.s. normal değerlerinin en az 5 katına kadar yükselir, fakat üst sınırının nereye ulaştığı henüz saptanamamıştır.

Yukarıda belirtilen genel durum değişimleri hem insanlarda hem hayvanlarda fizyolojik durumu etkiler, bu etki de genellikle ilaçların farmakokinetiğini değiştirebilir. Genel durumun değişimine neden olan faktörlerin üst sınırı tahmin edilemeyecek kadar değişkenlik gösterebilir. Bu nedenle olayı etkileyen

adrenalin miktarını kısıtlamak ve standardize etmek mümkün değildir. Bu değer artması temel değer olarak verilen yoğunlukların üstünde her hangi bir miktar olabilir.

Ateş oluşum mekanizmasında, hipotalamik yol hipotalamus'ta, beyin korteksinde ve omurilikte bir çok efektör sistemi etkiler. Bunlarla birlikte hormonların salgılanması da etkilenir (tiroid hormonları, epinefrin ve norepinefrin gibi adenokortikal hormonlar) (35).

Epinefrin ve norepinefrin termostazi geç etkileyen sistemleri oluşturur ve bunlar ateş tablosunda bazı hücre ve metabolizma değişiklikleri cevabı olarak alınır. Gergin ve sıkıntılı durum epinefrin salgılanması ile ilgilidir (35).

Epinefrinin etkisi önce terleme, sıcak basması olarak görülür fakat asıl etki odakları kalp, vasküler sistem ve düz kaslardır. Vazopressör ilaçların en etkinidir: kan basıncını yükseltir, nabız basıncı artar ve nabız sıklaşır (40).

Vasküler sistemde ise deri dolaşımını yavaşlatır, kapillerleri daraltır, böbrek vasküler direncini artırır ve böbrek kan akımını %40 kadar azaltır. Glomerüler filtrasyon çok az etkilenir. Sodyum, potasyum ve klor atılımı azalmıştır, idrar miktarı artabilir, azalabilir veya değişmiyebilir. Tübüler filtrasyon etkilenmez ama juxtaglomerular apparatus'taki β -reseptörleri etkileyerek renin salgılanması artar.

Epinefrin çok kuvvetli kalp stimülanıdır, kalp kası uyarılması artar, oksijen ihtiyacı artar.

Düz kaslara etkisi ise kasta bulunan adrenerjik resptörlere bağlıdır. Gastrointestinal sistemde epinefrinin etkisi ile düz kaslar genellikle gevşer. Barsak hareketleri yavaşlar, mide kasları gevşer, ama pilor ve ileoçekal sfinkterler genellikle kasılır.

Mesane duvarını gevşetir fakat trigon ile sfinkterler kasılır. Bu da hastanın idrar yapmasında kararsızlık belirtisi olarak görülür, mesane doludur fakat boşalamaz.

Solunum yollarındaki etkisi solnumun sıklaşması ile kendini belli eder.

Metabolik etkileri önemlidir: kanda glükoz ve laktat seviyelerini yükseltir. Lipolitik etkisi vardır, serbest yağ asitleri yoğunluğu artar, buna bağlı olarak plazma kolesterol, fosfolipit ve LDL miktarları artar.

Metabolizmaya en önemli etkisi epinefrinin kalorijenik etkisidir. insanda oksijen ihtiyacını %20-30 artırır.

Değişik etkilerinden bazıları ise şöyle özetlenebilir: proteinden yoksun sıvıları ekstrasellüler aralığa vererek plazma hacmini azaltır, böylece eritrosit ve plazma proteinleri konsantrasyonları artar. Ayrıca total lökosit sayısı da artmıştır.

Epinefrin uzun zamandan beri insanlarda ve hayvanlarda V.faktörün aktivitesini arttırarak kanın pıhtılaşmasını hızlandırdığı bilinmektedir.

Göz yaşı yapımını, tükürük salgılanmasını ve tükürükteki

amilaz yoğunluğunu artırır.

Kanda stabil olmakla birlikte vücutta çok çabuk inaktive olur. Bu inaktivasyon olayı genellikle karaciğerde ve böbreklerde seyreder ve vanilil mandelik asit ile metoksihidroksifenilglükol olarak böbrekten atılır.

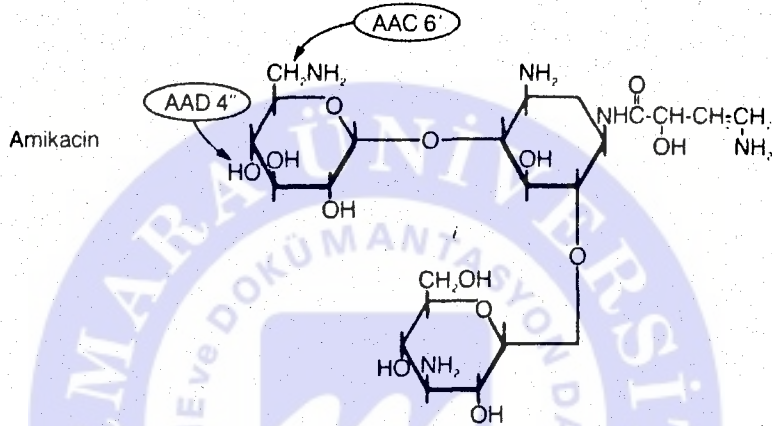
Epinefrin sıkıntı, gerginlik, sersemletici baş ağrıları, titreme, halsizlik, solunum sıkıntısı ve çarpıntıya neden olur. Hasta telaşlıdır.

Bütün bu etkiler vücutta epinefrin miktarı normal sınırların üstüne çıktığı zaman görülür.

Bakterilerde, örneğin E.Coli'de, laktozu metabolize eden enzimlerin yanı sıra, cAMP, galaktoz ve diğer karbonhidratların metabolizmasını düzenler. Epinefrin (β -adrenerjik reseptörler aracılığı ile) ve glukagon (glukagon reseptörlerine bağlanarak) karaciğerde adenilat siklazı aktive ederler, bu da cAMP birikmesini stimüle eder.

Epinefrin tedavi amacı ile de dışarıdan verilerek kullanılabilir, özellikle ilaçlara ve başka allerjenlere (penisilin ve diğer ilaçlar, yiyecekler, polen ve diğer allergenler) aşırı duyarlılık reaksiyonlarında çabuk tedavi amacı ile kullanılır. Doğal olarak vücutta artarak veya dışarıdan verilerek epinefrin bazı ilaçlarla birlikte bulunduğu epinefrinin idrar seviyesini artırır. Bu ilaçlar şunlardır: aminofilin, kafein, reserpin, eritromisin, tetrasiklin, kinidin, v.b.

AMİKACİN HAKKINDA GENEL BİLGİLER



Amikacin 1972 yılında aminoglikozitler grubundan Kanamicin A'nın yarı sentetik türevi olarak elde edilmiştir. Kanamicin, %98 A ve %2 B ve C fraksiyonlarından oluşmaktadır buna karşılık Amikacin tek maddeden oluşmaktadır. 1977 de klinik kullanıma girmiştir (18,34).

iki amino şekeri vardır ve bunlar glikozit bağları ile merkezde bulunan bir heksoza bağlıdır. Bu şeker bir 3-amino heksozdur (glükozamin) (34).pH 6-8 arası stabildir ve bazik yapıdadır. Suda erir, ekstrasellüler sıvıda vucuttaki hacminin %25'i olarak bulunur (15).Metabolik olarak sabittir, %95'i böbreklerden atılır (21).

Barsaklardan zor emilir. Polaritesi yüzünden intrasellüler sıvıya ve beyin omurilik sıvısına geçmez. Oral olarak emilmez (34). Çok geniş antimikrobiyal aktivitesi vardır. Gram pozitif koklara ve Gram negatif çomaklara etkilidir. Ancak tek başına verildiğinde enterokoklara ve anaeroplara etkisizdir (22).

Etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Antibiyotik hücre yüzeyine bağlanır ve buradan hücre içine taşınarak 30S ribozomal alt üniteye bağlanır. Buradan translasyon esnasında mRNA yanlış okunur ve anlamsız aminoasitler oluşur. Protein sentezi ile bu şekilde interferens yapması hücre zarının fonksiyonunun bozulmasına neden olur. Sodyum, potasyum, aminoasit ve esas maddelerin hücreden sızmasına yol açar ve hücre ölür(34).

Amikacin, hatta genel olarak aminoglikozitlere direnç gelişmesi değişik yollarla olur:

**Bir amino grubunun asetilasyonu, bir hidroksil grubunun adenilasyonu veya fosforilasyonu ile molekül öyle değişir ki ribozomal alt üniteye bağlanamaz. Burada rol oynayan enzimler asetiltransferaz, adeniltransferaz ve fosfotransferazdır.

Amikacin aminoglikozitler içinde inaktivasyona en dirençli antibiyotiktir. Sadece Gram negatif organizmaların asetiltransferazı ile inaktive olur. Stafilokokların adeniltransferazının miktar olarak yetersiz kalması bu direnç yolunu pek olası kılmamaktadır (18,34).

**Bir başka yol ise sitoplazmik zarın enerjiye bağımlı transport sistemi değişmesi ve antimikrobik ajanın hedefine ulaşamaması yani ribozoma bağlanamaması şeklindedir. Bazı Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalar bu yolla direnç kazanırlar (18,34).

Diğer aminoglikozitler gibi Amikacin'in de nefrotoksik etkisi vardır ancak bu etki Gentamicin'inkinden daha azdır. Vestibülotoksik etkisi diğer aminoglikozitlerle aynı, kokleotoksik etkisi ise daha fazladır (34).

Kullanım endikasyonuna gelince, çoğu merkezlerde rezerv antibiyotik olarak saklanmakla birlikte bazı merkezler bu antibiyotiği en gözde antibiyotik olarak kullanmaktadırlar, çünkü direnç gelişmesi çok düşük oranda saptanmıştır. Bu nedenle hastalarda ve hastane enfeksiyonlarında en başarılı antibiyotik olarak hem Gram negatif çomaklar hem Gram pozitif koklara karşı kullanılmaktadır (10,14,18).

Staphylococcus aureus endokarditi vakalarında penisilinaze etkisiz penisilin ile kombine olarak kullanılmaktadır.

Yine vankomisin ve rifampisin ile kombine olarak prostetik kapaklı stafilokok endokarditi vakalarında kullanılmaktadır (18).

STAPHYLOCOCCUS AUREUS HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar Micrococcaceae ailesinde fakültatif anaerop veya mikroaerofil mikroorganizmalardır. Hücre duvarları L-lizin ihtiva eden peptidoglikandan ve teikoik asitten oluşur. 0.5-1.5 µm çapında yuvarlak hücrelerdir, tek, çift veya kümeler halinde bulunurlar. Bir çok yönde bölünebildikleri için düzensiz kümeler oluştururlar. Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz ve çoğu kapsülsüzdür. Aerobik şartlarda daha bol ve daha çabuk ürerler. NaCl'li ortamda daha kolay üremektedirler ve optimal ısı 18° C ile 40° C arasındadır. İçinde pepton bulunan hemen her çeşit besiyerinde rahat ürerler. İçinde azot kaynağı olarak aminoasit ve B vitamini bulunan her besiyerinde kolayca ürerler. Lizozime dirençli fakat lizostafine hassas bir yapıları vardır (28).

Stafilokoklar sporsuz bakteriler arasında en dirençli mikroorganizmalardandır. Kuruluğa ve yüksek ısı derecelerine dirençlidirler, kurumuş cerahat ve balgamda günlerce, haftalarca canlılıklarını korurlar. 60° C deki nemli ısıda 30 dakika kadar canlı kalırlar. Fenollere, diğer bir çok dezenfektana ve yüksek tuz konsantrasyonlarına (% 7,5-10 NaCl) dirençlidirler (11).

Normalde deri, deri bezleri ve mukozalarda bulunur. Ancak oportünist patojen bir mikroorganizmadır. Klinik materyel olarak kan, abse, pürülan sıvılar, balgam, idrar ve gaitadan izole edilebilirler. %5 koyun kanlı agara ekim yapılarak 34°-37° C de

18-24 saat inkübe edildiğinde Stafilokoklar 1-3 mm çapında, yuvarlak, yumuşak, kabarıklık, opak veya katı yağ görünümünde koloniler oluştururlar (28).

Katalaz pozitifdirler, sitokromları vardır, dolayısıyla ben-zidin pozitifdirler.

Katı besiyerinde pigment oluştururlar; gri-beyaz renkten sarı-turuncuya varan bir renklenme görülür. Bu renklenme hücre zarında bulunan karotenoid pigmentlerden kaynaklanır. Besiyeri pigment oluşumunu etkiler. Karbon dioksit ve oksijen pigment oluşumu için esastır. Kültür eskidikçe veya çok fazla pasaj yapıldıysa pigment oluşturma yeteneğini irreversibl olarak kaybeder (26).

Staphylococcus aureus oportünist patojen olan bir türüdür. 0.5-1 µm çapında küre şeklindedir, tek başına, çift olarak veya kümeler halinde görülür (28).

Bir çok hastalık tablosunda izole edilebilir ve kronik veya reküran enfeksiyonlarda sıklıkla karşımıza çıkar (16).

Kolonileri S tipi, kabarıklık, parlak, yuvarlak düzgün kenarlı ve opaktır. Koloniler 6-8 mm çapına ulaşabilir ve kültür eskidikçe koloniler şeffaflaşmaya başlar. Çoğu altın sarısı pigment oluşturur.

Fakültatif anaerop olmakla birlikte en iyi aerop ortamda ürer. Katalaz aerobik ortamda üreyen mikroorganizmalarda üretilir. Oksidaz negatiftir (17).

Besiyerinde NaCl bulunursa (<10) iyi bir üreme gözlenir.

10° C ile 45° C arasında ve pH= 4.2 ile 9.3 arasında üreyebilir. Optimum ısı 30° C ile 37° C arası ve optimum pH 7.0-7.5 arasındadır.

Lityum klorit, baryum klorit, kristal viyole, akridin gibi bazı maddeler *Staphylococcus aureus*'un üremesini inhibe ederler.

Glükoz, laktoz, maltoz ve mannitol gibi bazı şekerlerden aerobik ve anaerobik olarak asit oluşturur. Sadece aerobik olarak fruktoz, galaktoz, mannoz, riboz, sükroz, trehaloz, turanoz ve gliserolden asit oluşturur (26).

Eskülin ve nişastayı hidrolize etmez. Üreyi ve hemoglobin, fibrin, albumin, kazein gibi doğal hayvan proteinlerini hidrolize eder. Birkaç günde jelatini eritir. Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer deneyleri pozitifdir. Üremek için organik azot kaynağı ile B grubu vitamene ihtiyaç gösterir. Nitratı indirger ve amonyak oluşur. Ayrıca asit ve alkali fosfataz üretir.

Koagülaz bütün sular tarafından oluşturulur. Koagülaz serbest ve bağlı olarak bulunur (9,38). *Staphylococcus aureus* suları ısıya dayanıklı dezoksiribonükleaz oluşturur (3). Bu özellik *Staphylococcus aureus*'un besinlerden izolasyonunda çok yardımcı olur. Hemolizin üretir. α , β , τ ve δ olarak 4 grup hemolizin bulmak mümkündür. Bir suş tek veya kombine olarak birkaç hemolizin üretebilir (41).

Bazı suşlar epidermolitik toksin (exfoliatin), bazıları ise besin zehirlenmelerine neden olan enterotoksin oluşturur. Bazı suşlarda enterotoksin benzeri protein bulunur, TSS (Toksik Şok

Sendromu) tablosunu meydana getirirler. Stafilokinaz, lökositin, hiyaluronidaz, lipazlar, proteinazlar ve penisilinazlar Staphylococcus aureus suşlarının biyolojik aktif diğer bazı hücre dışı ürünleridir (6).

Staphylococcus aureus genellikle burun ve ağız mukozasında (oronazofarenks), deride, perinede, gastrointestinal ve genital sistemde doğal olarak bulunur (16).

insanlarda doğal nazal taşıyıcılık oranı %10-40 arasındadır. Staphylococcus aureus potansiyel patojendir ve çok sayıda enfeksiyona neden olur. En sık olarak selülit, püstül, bül, karbunkl, impetigo ve çeşitli postoperatif yara enfeksiyonları gibi deri enfeksiyonlarına neden olur (16).

Toplumdan kaynaklanan bir başka önemli tablosu ise ısıya dayanıklı enterotoksinler aracılığı ile meydana gelen besin zehirlenmeleridir (16).

Daha önemli ve ağır seyirli olan sepsisemi, endokardit, menenjit, pnömoni ve osteomyelit tablolarını da oluştururlar.

Enfeksiyonun etiyolojisine göre Staphylococcus aureus suşları besiyerinde özel katkı maddelerine ihtiyaç gösterebilir; örneğin tiamin veya menadion'a ihtiyaç gösterenler genellikle osteomyelit veya sepsisemi yaparlar, CO₂ ihtiyacı olan suşlar ise genellikle sepsisemi etkenidirler (11).

Staphylococcus aureus suşları bakteriyofaj tiplendirilmesi ile de ayırt edilir. Özellikle hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde bu yöntem büyük önem taşımaktadır (17).

Staphylococcus aureus'a karşı çeşitli antibiyotik duyarlılık testleri kullanılır. Ayrıca bazı stafilokok türlerini ayırt etmek için duyarlılık testleri kullanılabilir, örneğin Novobiocin Staphylococcus saprophyticus'un diğer stafilokoklardan ayırımında kullanılır. Çok sayıda antibiyotiğe örneğin aminoglikozitlere, sefalosporinlere, penisiline ve türevlerine, kloramfenikole, TMP-sülfametaksazole ve vankomisine karşı duyarlılık testleri yapılabilir (32).

Bir antibiyotik klinikte kullanıma girdiği zaman Staphylococcus aureus'un çok kısa zamanda buna karşı direnç geliştirdiği gözlenmiştir (7). 1942'den önce izole edilen suşların çok sayıda antibiyotiğe duyarlı olduğu bilinmektedir. 1945'ten sonra ise, önce hastanelerde sonra toplumda ve en son hayvanlarda, penisilinaz oluşturan suşların hızla arttığı gözlenmiştir (2). Daha sonra Metisiline karşı olmak üzere ikinci bir penisilin direncinin gelişmesi gözlenmiştir. Bu, bütün penisilinlere ve sefalosporinlere geniş çapta bir direnç gelişmesini göstermektedir (31).

Staphylococcus aureus'un yaygın kullanılan antibiyotiklere kısa zamanda direnç geliştirmesi hastane enfeksiyonları açısından çok büyük önem taşımaktadır. Bilindiği gibi nozokomiyal enfeksiyonlarda rastlanan en önemli ajanlardan biri Staphylococcus aureus'tur (31). Bu enfeksiyonları meydana getiren suşlar çok dirençli olanlardır, dolayısıyla tedavileri de o denli güç olmaktadır (7).

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇLER

Bu çalışmada M.Ü.Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen klinik materyelden izole edilen 12 Staphylococcus aureus suşu kullanılmıştır. Bunlardan 5 tanesi yara, 3 tanesi idrar, 1 tanesi boğaz, 1 tanesi kist ponksiyon sıvısı kültürlerinden izole edilmiştir. Kontrol olarak Staphylococcus aureus ATCC 6538 ve Staphylococcus aureus ATCC 29231 suşları kullanılmıştır.

Suşlar izole edildikten sonra aşağıdaki özellikleri ile Staphylococcus aureus oldukları kanıtlanmıştır:

*Suşların hepsi adi jeloz besiyerinde pigment oluşturmuşlardır.

*Koyun kanlı agar'a ekildiklerinde hepsinin α ve β olarak karışık hemoliz yaptıkları gözlenmiştir.

*Lam üstünde ve tüpte 1:1 ile 1:10 arası sulandırılmış plazma ile koagülaz pozitif sonuç alınmıştır.

*Dezoksiribonükleaz testi için DNase test agar (Difco) kullanılmış ve bütün suşlar DNaz pozitif bulunmuştur.

*Tuzlu besiyeri olarak Mannitol Salt Agar (Gibco) kullanılmış ve bütün suşlar bu besiyerinde mannitolü fermente

etmişlerdir.

*Rutin olarak yapılan disk diffüzyon yöntemi ile bütün suşlar Amikacin'e duyarlı bulunmuştur.

Bütün deney aşamaları boyunca besiyeri olarak Nutrient Broth (Lab M) kullanılmıştır. Bu besiyerinin içeriği :

Beef extract	1 g	Yeast extract	2 g
Peptone	5 g	NaCl	5 g

Besiyerinin pH sı 7.4 e ayarlanmış ve otoklavda 121°C de sterilize edilmiştir.

Adrenalin 0,5 mg/ml konsantrasyonda steril ampulde Adrenaline Codex (Galen ilaç Laboratuvarı) olarak kullanılmıştır ve steril damıtık su ile sulandırılmıştır. Adrenalin tüplere 12.5 pg/ml den 12.5 µg/ml ye değişen oranlarda ilave edilmiştir. Bu miktarlar kandaki normal değerleri ile bu değerlerin 10⁶ misline varan oranlarda hazırlanmıştır.

Aktivitesi 681 µg/ml olan Amikacin sulfatı Fako ilaç Fabrikalarından sağlanmıştır. Antibiyotik çözeltileri steril damıtık suda hazırlanmıştır.

Plazma olarak O Rh(+) inaktive edilmiş insan plazması kullanılmıştır.

KULLANILAN ARAC VE AYGITLAR

Sartorius analitik hassas terazi (0.0001 g hassas)

Sartorius marka kaba terazi (0.01 g hassas)

Heraeus B 5042 marka etüv

Heraeus B 50 marka etüv

Kermanlar dikey otoklav

Transmedikal prizmatik otoklav

Elektromag M 5040 pastör fırını

Elektromag su banyosu

Nüve NF 815 santrifüj

Heraeus Digifuge GL (büyük başlıklı) santrifüj

Arçelik 415 marka soğutucu

Uğur Derby derin dondurucu

Kötterman distile su aygıtı

Millipore OM 037 ve OM 041 filtrasyon sistemleri

Millipore Millex HA 0.45 µm tek kullanımlık filtreler

Nunc U tabanlı mikrotitrasyon plakları

Mikropipetler:Oxford Sampler System 40-200 µl ile 200-1000µl

Brand Transferpette 20-100 µl ile 200- 1000 µl

Cam pipetler:0.5 ml (Witeg),1-2 ml (Superior),

5-10 ml (Prescicolor).

Dispenser Hirschman 1-5 ml

Petri kutuları (Anumbra)

Serolojik tüpler (Teknikcam 12 mm çapta)

YÖNTEMLER

1-Bakteri süspansiyonunu hazırlama yöntemi:

Bakteri süspansiyonunun hazırlanması için katı besiyerinde (kanlı agar) üremiş kolonilerden öze ile 4-5 koloniye degecek şekilde materyel alınmış ve sıvı besiyerine (Nutrient broth) ekilmiştir. 18 saat 37° C de inkübe edildikten sonra bu bakteri süspansiyonları Mc Farland 0,5 standartına göre ayarlanmıştır (bakteri konsantrasyonu takriben $1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Bu süspansiyon 10 defa sulandırılarak ve her tüpe veya her mikrotitrasyon kuyusuna ilave edildiğinde sonuçta ortalama 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde ayarlanmıştır (5,24,25,39).

2-Antibiyotik çözeltisini hazırlama yöntemi:

Amikasin'in konsantrasyonu 1000 µg/ml olacak şekilde antibiyotik stok solüsyonu hazırlanmış ve hemen kullanılmayacak olan bölümü fraksiyone edilerek derin dondurucuda -20° C de muhafaza edilmiştir. Kullanılacak olan bölüm ise seri dilüsyon yapıldığında, her deneyde birinci tüpte veya kuyuda 50 µg/ml olacak şekilde konsantrasyonu ayarlanmıştır (39).

3-Adrenalin cözeltisini sulandırma yöntemi:

Adrenalin konsantrasyonu 500 µg/ml olarak steril ampulde sağlanmıştır. Dilüsyonlar bitince son konsantrasyonlar 12.5 µg/ml, 125 ng/ml, 12.5 ng/ml, 125 pg/ml ve 2.5 pg/ml olacak şekilde sulandırılmıştır.

4-Plazmanın hazırlanması:

O Rh(+) insan kanı santrifüj edilerek plazma ayrılmış, filtrasyon ile steril edilmiş ve fraksiyone edilerek dondurulmuştur. Ayrıca taze dondurulmuş O grubu insan plazması da aynı amaçla sağlanmış, kullanılmadan önce çözündürülmüş ve filtre edilmiştir. Sulandırmaya geçmeden önce 56°C de yarım saat inaktive edildikten sonra plazma kullanılmıştır. Bütün serilerde son konsantrasyon 1:1 olarak ayarlanmıştır.

Deney üç seri halinde, aynı şartlarda yürütülmüş ve iki defa makrodilüsyon, bir defa mikrodilüsyon yöntemi ile tekrarlanmıştır.

Makrodilüsyon yöntemi:

Bu yöntemle deney üç seri halinde yürütülmüş ve iki defa tekrarlanmıştır.

Her seri 12 tüpten oluşmuştur. Birinci tüp sadece besiyeri ve antibiyotik, onikinci tüp ise sadece besiyeri ve bakteri süspansiyonu içeren kontrol tüpleri olarak kullanılmıştır. İkinci tüplerde son antibiyotik konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde stok antibiyotik çözeltisi sulandırılarak ilave edilmiştir (13,25).

*Birinci seri:

1-tüplere 0.5 ml sıvı besiyeri konmuştur.

2-antibiyotik çözeltisinden 0.5 ml ilave edilerek seri dilüsyon yapılmıştır.

3-Mc Farland standartına göre 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde ayarlanan bakteri süspansiyonundan kontrol tüpünden başlamak üzere her tüpe 0.5 ml ilave edilmiştir.

*İkinci seri:

Bu seri altı defa 12 tüplük dizilerden oluşmuştur. Her dizi ayrı adrenalin konsantrasyonunda hazırlanmıştır.

1-tüplere adrenalin, son konsantrasyonları 12.5 µg/ml, 125 ng/ml, 12.5 ng/ml, 125 pg/ml ve 12.5 pg/ml olacak şekilde ve sıvı besiyeri konmuştur.

2-antibiyotik çözeltisi birinci seride olduğu gibi ilave edilerek seri dilüsyon yapılmıştır.

3-bakteri süspansiyonu birinci seride olduğu gibi ilave edilmiştir.

*Üçüncü seri:

Bu seri altı defa 12 tüplük dizilerden oluşmuş, her dizi ayrı adrenalın konsantrasyonunda hazırlanmıştır.

1-tüplere sıvı besiyeri, son konsantrasyonları 12.5 µg/ml, 125 ng/ml, 12.5 ng/ml, 125 pg/ml ve 12.5 pg/ml olacak şekilde adrenalın ve son konsantrasyonu 1:1 olacak şekilde plazma konulmuştur.

2-antibiyotik çözeltisi gene birinci seride olduğu gibi ilave edilerek seri dilüsyon yapılmıştır.

3-bakteri süspansiyonu da gene birinci seride olduğu gibi ilave edilmiştir.

Mikrodilüsyon yöntemi:

Bu yöntemde etilen oksit ile steril edilmiş microplate'ler kullanılmıştır.

Makrodilüsyon yönteminde yapılan işlemler mikrodilüsyon plaklarında tekrarlanmıştır. Bu yöntemde her kuyuda son sıvı miktarı 100 µl olacak şekilde yukarıda belirtilen solüsyonlar ve çözeltiler ilave edilmiştir. Birinci kuyu sadece besiyeri ve antibiyotik, onikinci kuyu ise sadece besiyeri ve bakteri süspansiyonu içeren kontrol kuyuları olarak alınmıştır (13).

*Birinci seri:

1-kuyulara 0.05 ml besiyeri konmuştur.

2-antibiyotik çözeltisi 0.05 ml ilave edilerek seri dilüsyon yapılmıştır.

3-onikinci kuyudan başlamak üzere, Mc Farland standartına göre 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde ayarlanan bakteri süspansiyonu ilave edilmiştir.

*ikinci seri:

1-adrenalinin son konsantrasyonları altı dizi kuyuda 12.5 µg/ml, 125 ng/ml, 12.5 ng/ml, 125 pg/ml ve 12.5 pg/ml olacak şekilde adrenalin ve sıvı besiyeri ilave edilmiştir.

2-antibiyotik çözeltisi birinci seride olduğu gibi ilave edilerek seri dilüsyon yapılmıştır.

3-bakteri süspansiyonu da birinci seride olduğu gibi ilave edilmiştir.

*Üçüncü seri:

1-altı dizi kuyuya son konsantrasyonları ikinci seride belirtildiği gibi adrenalin konmuş, sıvı besiyeri ve plazma son konsantrasyonu 1:1 olacak şekilde ilave edilmiştir.

2-antibiyotik çözeltisi birinci seride olduğu gibi ilave edilerek seri dilüsyon yapılmıştır.

3-bakteri süspansiyonları birinci seride olduğu gibi ilave edilmiştir.

Dilüsyonlar tamamlandıktan sonra, buharlaşmayı önlemek için plakların üstü sıkıca kapatılmıştır.

Bütün tüpler veya plaklar aynı şartlar altında 37°C de inkübe edilmiş ve her gün sonuçlar okunarak inkübasyona 5 gün süre ile devam edilmiştir.

Beşinci gün MIC değerleri alındıktan sonra üreme olmayan tüplerden veya kuyulardan çukolata agarlı besiyerine pasaj yapılmıştır. 24 saat 37°C de ve bunu takip eden 4 günde 30°C bekletildikten sonra MBC değerlerine bakılmış ve üreme görülmediği takdirde deney sonlandırılmıştır.

MIC değeri gözle görülür şekilde üremeyi inhibe eden en az antibiyotik miktarı olarak alınmıştır (5,19,25).

MBC değeri ise üreme olmayan tüplerden veya kuyulardan materyel katı besiyerine ekildiğinde üreme olmayan en düşük antibiyotik konsantrasyonudur (19,29).

BULGULAR

Deneye başlamadan önce , 12 Staphylococcus aureus suşunun hepsinin disk diffüzyon yöntemi ile Amikasine duyarlı oldukları saptanmıştır .

Makrodilüsyon yöntemi bulguları

Makrodilüsyon yöntemi ile alınan sonuçlarda ilk gün elde edilen MIC değerlerinin 0.09 µg/ml ile 0.19 µg/ml arasında olduğu bulunmuştur .

Normal ekim olarak gruplandırılan birinci seri çalışmada (yalnız besiyeri, antibiyotik ve bakteri bulunan seride), beşinci günün sonunda MIC değerlerinin 5 ile 6 dilüsyon arttığı görülmektedir (Tablo 1).

İkinci seri çalışmada, ortama çeşitli oranlarda adrenalin ilave edilince MIC değerleri 5. günün sonunda ancak ortalama 2 dilüsyon fark etmiştir (Tablo 2,3,4,5,6).

Üçüncü seride (plazma ve adrenalin içeren seri) 5. günün sonunda MIC değerleri 1 ile 2 dilüsyon artmış ve üreme olan tüplerde koagülasyon görülmüştür (Tablo 7,8,9,10,11).

Mikrodilüsyon yöntemi bulguları

Mikrodilüsyon yöntemi ile yürütülen çalışmada birinci gün elde edilen sonuçlarda MIC değerlerinin 0.09 µg/ml ile 0.19 µg/ml arasında olduğu görülmüştür .

Birinci seri deneylerde, beşinci günün sonunda MIC değerleri 5 ile 6 dilüsyon artmıştır (Tablo 1).

İkinci seride ise, adrenalın ilave edince, MIC değerleri ortalama 2 dilüsyon artmıştır (Tablo 2,3,4,5,6,).

Üçüncü seride ise, adrenalın ve plazma ilave edilince, MIC değerleri 1 ile 2 dilüsyon artmış ve üreme olan kuyularda koagülasyon görülmüştür (Tablo 7,8,9,10,11).

MBC değerleri ise bütün yöntemlerde ve bütün serilerde MIC değerleri ile paralel seyretmiştir, elde edilen MIC değerleri ile MBC değerleri aynı konsantrasyonlarda bulunmuştur.

Beş gün sonunda MBC değerlerine bakılırken aynı zamanda son üreme olan tüpten veya kuyudan Nutrient broth'a pasaj yapılmıştır. Bu kültürler 18 saat 37°C de inkübe edildikten sonra tekrar MIC değerlerine bakılmıştır. Bütün deney aşamalarında MIC değerleri beşinci günün sonunda alınan değerlerle aynı çıkmıştır. Bu sonuçlar bize bu Staphylococcus aureus suşlarının 5 gün içinde gerçekten Amikacin'e karşı direnç kazandıklarını göstermiştir.

Bütün bu değerlere bakıldığında normal laboratuvar

yöntemleri ile yürütülen MIC çalışmalarında 5 günde Staphylococcus aureus suşlarında Amikasine karşı 5 dilüsyona varan, birinci gün elde edilen sonucun 32-64 katı olarak bir direnç artışı olduğu gözlenmiştir. Ancak ortama adrenalın veya adrenalın ile plazma ilave edildiğinde ancak 1-2 dilüsyonluk bir direnç artışı olmuş, yani ilk konsantrasyonunun 2 ile 4 katı olarak artmıştır.



TARTIŞMA

Staphylococcus aureus klinik materyellerde çok sıklıkla rastlanılan mikroorganizmalardan biridir. Normal florada bulunması bu mikroorganizmayı normal flora bakterileri ile birlikte düşünmeye yöneltmiştir. Fakat Staphylococcus aureus potansiyel patojen olma özelliğinden dolayı çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Staphylococcus aureus bütün dünyada hastane enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biri olmaya devam etmektedir (31). Yeni patojenik yetenekler kazanma eğilimindedir (32).

Antibiyotik kullanımı ile çok kısa sürede stafilokokların direnç kazandıkları gözlenmiştir (7). Antimikrobik ajanlara karşı kısa sürede direnç geliştirmesi bazı antibiyotiklerin bu mikroorganizmaya karşı kullanımlarını sınırlamıştır (2,7,31). Özellikle penisilin ve türevlerine karşı gelişen direnç Gram pozitif kokların yol açtığı enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır (27). Bu yüzden yeni veya değişik antibiyotik türlerini kullanmak gerekmektedir. Amikacin hem Gram pozitif kokların hem Gram negatif çomakların meydana getirdiği, ayrıca diğer aminoglikozitlere dirençli bakterilerle olan enfeksiyonlarda en gözde antibiyotiklerden biridir. Bu antibiyotiğe karşı mikroorganizmaların çok az direnç geliştirdiği gözlenmiştir (19).

Duyarlılık testleri sonucu elde edilen veriler ile tedaviye başlandığında, bazı vakalarda in vitro dirençli bulunan bir antibiyotik hastaya uygulandığı zaman iyi sonuç alındığı gözlenmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, bu farklılığın mikroorganizmaların üretildiği ortamdan kaynaklandığı düşünülerek, in vivo koşullara yakın bir ortamın in vitro şartlarda sağlanması ve plazma gibi, adrenalin gibi bazı vücut faktörlerinin bakteri-antibiyotik etkileşmesinde bir rolü olup olmadığı araştırılmıştır (8,19).

Besiyerine kanda bulunması gereken maddelerin katılması ile in vivo'ya yakın bir ortam sağlanmıştır. Bunun için ortama önce adrenalin daha sonra hem adrenalin hem plazma ilave edilmiştir.

Besiyeri ve Amikacin çözeltisi bulunan ortama Staphylococcus aureus ekildiğinde beş gün içinde MIC değerlerinde 5-6 dilüsyon artma gözlenmektedir. 5 gün bekledikten sonra MIC değeri artmakla beraber hala duyarlı konsantrasyon sınırında kaldığı gözlenmiştir (Tablo 1).

Staphylococcus aureus'un Amikacine duyarlılık gösteren değeri $MIC \leq 8 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır (12). Bakteri 5 gün antibiyotikli besiyerinde bekledikten sonra bizim bulduğumuz değer ise $MIC=6.25 \mu\text{g/ml}$ dir. MBC değerlerimiz de $6.25 \mu\text{g/ml}$ değerlerini aşmamıştır. Bir çalışmada aminoglikozit olarak Gentamicin'e karşı $MIC=20 \mu\text{g/ml}$ ve $MBC=35 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur (30). Bizim çalışmamızda ise Amikacin ile bu değerlere ulaşılamamıştır. Bu da bize stafilokokların Amikacin'e

karşı duyarlı olduklarını göstermektedir.

In vitro deneylerde ortama adrenalın katılması adrenalinin böbreklerden atılması açısından önemli bulunmuştur. Ayrıca Amikacin de aynı yolla böbreklerden atılmaktadır. Stres ile veya çeşitli faktörlerden dolayı kandaki adrenalın seviyesinin yükselmesinin ilaçların farmakodinamiğini ne kadar etkilediği ise henüz bilinmemektedir (20,33). Amikacin ile adrenalinin böbreklerden atılması, böbrek kan dolaşımının değişimine bağlı olarak klirens farkı gösterebilmektedir (20,33). Adrenalin seviyesi kanda yükseldiği takdirde, böbrek dolaşımı yavaşlamakta, adrenalın ve amikacinin klirensi de azalmaktadır (33).

Literatürde antibiyotiklerin adrenalın ve plazma bulunan ortamdaki aktiviteleri ile ilgili fazla çalışma yoktur.

Selli'nin yaptığı bir çalışmada besiyerine adrenalın ve plazma ilavesinin stafilokokların gentamisine karşı direnç geliştirmelerini engellediği; normal koşullarda stafilokokların besiyerine 40 µg/ml lik konsantrasyonda ilave edilmiş gentamisine dirençli olduklarını, halbuki besiyerine plazma ve adrenalın ilave edildiğinde sadece 4 µg/ml gibi oldukça düşük bir gentamisin konsantrasyonuna dirençli olduklarını bildirmiştir (30).

Stresin miktarı tahmin edilemeyeceğinden, plazmada değişik yoğunlukta bulunan adrenalinin etkisi araştırılmıştır ve görülmüştür ki adrenalın kanda normal fizyolojik seviyelerde bulunduğu halde ve strese bağlı olarak bu seviyenin 10⁶ katı daha yoğun bulunduğu hallerde de aynı etkiyi gösterebilmektedir.

Hangi yoğunlukta olursa olsun adrenalin Staphylococcus aureus'un Amikacine karşı duyarlılığında bir değişiklik yapmamıştır (Grafik 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12).

Yine in vivo'ya yakın bir ortam sağlamak amacı ile ortama plazma ile adrenalin birlikte ilave edildiğinde, Staphylococcus aureus'un Amikacine duyarlı kaldığı tablo 7,8,9,10,11 de görülmektedir. Plazmanın ortama ilave edilmesi, insan serumunun antistafilokoksik ajanların meydana getirdiği otolitik aktiviteyi bastırmak amacını taşımaktadır (37).

Storch ve Krogstad, insan serumunun antimikrobik maddelerle oluşan bakteri erimesi ve ölümünü desteklemediğini saptamışlar, enterokok endokarditinin tedavisinde tek başına penisilinin etkisindeki azalmada, insan serumunun otolitik aktiviteyi baskılamasının önemli bir faktör olduğunu ileri sürmüşlerdir (36).

Stratton ve arkadaşları, metisiline duyarlı ve dirençli Staphylococcus aureus suşlarının antibiyotik etkisi ile erime ve öldürülmeleri ile çoğalmaları üzerinde insan serumunun Müller-Hinton buyyonundan daha az destekleyici olduğunu saptamışlar; üreme hızının serumda normal besiyerine nazaran daha az olmasının, hücre duvarına etkili antibiyotiklerin aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir (37).

Çalışmamızda Amikacinin aktivitesinin plazma mevcudiyetinde azalmadığı gözlenmiştir (Tablo 7,8,9,10,11).

Bizim çalışmamızdaki deney serisinde de, Adrenalin kon-

santrasyonundan bağımsız olarak Staphylococcus aureus'un Amikacine karşı duyarlı kaldığı gözlenmiştir. Tablo 1-11 ve grafik 1-12 de sonuçlar görülmektedir.

Selli, Wymola ve Hepding'in yaptıkları çalışmalar ile kıyaslanınca bulduğumuz MIC değerleri ile MBC değerleri onlarınkinden düşük bulunmuştur (30). Bulduğumuz MIC değerleri ile MBC değerlerine göre Amikacin'in hala Staphylococcus aureus suşlarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir .



ÖZET

Hastane enfeksiyonlarının önemli etkenlerinden *Staphylococcus aureus*, çeşitli antibiyotiklere direnç göstermektedir. Çalışmalarımızda *Staphylococcus aureus*'un Amikacin'e karşı duyarlılığı araştırılmıştır.

Bu araştırma üç aşamada yapılmıştır. İlk aşamada normal ekim adı verilen MIC çalışması yapılmıştır. İkinci aşamada 125 µg/ml, 125 ng/ml, 12.5 ng/ml, 125 pg/ml ve 12.5 pg/ml konsantrasyonlarında adrenalin ilave edilmiş ortamda MIC değerlerine bakılmıştır. Üçüncü aşamada ortama yukarıda belirtilen konsantrasyonda adrenalin ilave edilmiş, ayrıca 1:1 oranında plazma ilave edilerek MIC değerlerine bakılmıştır.

Bakteriler bu belirtilen ortamlarda bekletilerek 5 gün üst üste MIC değerleri kaydedilmiştir. Sonuç olarak normal ekim aşamasında, 5 günün sonunda, MIC değerlerinde 5-6 dilüsyon artma gözlenmiştir. Adrenalin ve plazma ilave edilmiş ortamlarda MIC değeri artışı sadece 1-2 dilüsyon olmuştur.

Staphylococcus aureus'un Amikacin'e karşı duyarlılığı adrenalinli ve plazmalı ortamda aynı kalmıştır, normal ortamda ise 5-6 dilüsyonluk fark görülmüştür.

SUMMARY

Staphylococcus aureus is one of the most common etiological agents of nosocomial infections. This microorganism is mostly resistant to many antibiotics.

The susceptibility of *Staphylococcus aureus* against Amikacin was investigated in three different conditions.

First the MIC value were examined in a standard MIC dilution test. Next epinephrine was added to the medium at the following concentrations : 125 µg/ml, 125 ng/ml, 12.5 ng/ml, 125 pg/ml and 12.5 pg/ml; and the MIC values were examined. Finally, the concentrations of epinephrine indicated above were added with plasma (in a 1:1 final ratio for plasma) to the medium and the MIC values were examined.

The cultures were maintained five days consecutively in an incubator and the MIC values were recorded every day.

It was observed that the MIC values in the normal medium (standard test) increased 32-64 fold. In the media containing epinephrine and plasma the increase of MIC values were only two to four fold.

The susceptibility of *Staphylococcus aureus* against Amikacin under standard conditions increased 32 to 64 fold, but in media containing epinephrine and plasma it increased only two to four fold.

KAYNAKLAR

- 1- Bassler M et al.: Antibakterielle Aktivität von Clindamycin und Lincomycin in Bouillon, Serum und in Kombination mit polymorphkernigen Granulozyten gegen Staphylococcus aureus und Staphylococcus epidermidis, Infection, 12 (4):280 (1984).
- 2- Bengtsson S et al.: In vitro aminoglycoside resistance of Gram negative bacilli and staphylococci isolated from blood in Sweden 1980-1984, Scand.J.Infect.Dis., 18:257 (1986).
- 3- Bergh K, Møland JA: Same-day confirmation of Staphylococcus aureus bacteraemia by thermonuclease test, Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. [B], 94:291 (1986).
- 4- van den Broek PJ et al.: Influence of human monocytes on the antibacterial activity of Kanamycin and Gentamicin for Staphylococcus aureus, Antimicrob. Agents Chemother., 29(6): 1032 (1986).
- 5- Çetin ET: Genel ve pratik mikrobiyoloji, Sermet Matbaası, 3.Baskı :439 (1973).
- 6- Chesbro WR, Wamola I, Bartley CH: Correlation of virulence with growth rate in Staphylococcus aureus, Can.J.Microbiol., 15(7): 723 (1969).
- 7- Cohen ML: Staphylococcus aureus: biology, mechanisms of virulence, epidemiology, J. Pediatr., 108 (5 Pt 2):796 (1986).

- 8- Espersen F: Interaction between human plasma proteins and cell wall components of *Staphylococcus aureus*, *Dan.Med.Bul.*, 34(2):59 (1987).
- 9- Flesland O: Comparison of two agglutination tests for differentiation between coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci, *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand.[B]*,95:83 (1987).
- 10- Hamilton-Miller JMT, Iliffe A: Antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci, *J.Med.Microbiol.*,19(2): 217 (1985).
- 11- Howard BJ,Kloos WE: *Staphylococci*, in *Clinical and pathogenic microbiology*, Howard BJ ed.,1.ed.,C.V.Mosby Company, St.Louis,Washington DC, Toronto, 231 (1987).
- 12- Huovinen P et al. : Aminoglycoside resistance among blood culture isolates, *J.Clin.Microbiol.*, 20(1):65 (1984).
- 13- Jones RN et al.: Microdilution and macrodilution broth procedures, in *Manual of Clinical Microbiology*, Lennette EH ed., 4.ed., American Society for Microbiology,Washington DC, 972 (1985).
- 14- Jones RN: In vitro evaluation of Amikacin: an assessment of the currently used methods of disk diffusion and dilution susceptibility, antimicrobial synergy and the measurement of Amikacin concentrations, *Am. J. Med.*, 30(80) Suppl.6B :88 (1986).

- 15- Juvin ME et al.: Comparaison de l'activité bactéricide de trois aminoglycosides: Gentamicine, Tobramycine, Amikacine, Pathol.Biol. (Paris), 35(5):461 (1987).
- 16- Kloos WE : Natural populations of the genus Staphylococcus, Ann.Rev.Microbiol.,34:559 (1980).
- 17- Kloos WE, Jorgensen JH: Staphylococci, in Manual of Clinical Microbiology, Lennette EH ed.,4.ed.,American Society for Microbiology,Washington DC, 143 (1985).
- 18- Korzeniowski OM, Hook EW : Aminocyclitols: aminoglycosides and spectinomycin, in Principles and Practice of Infectious Diseases, Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE ed.,1.ed., John Wiley and Sons, 249 (1979).
- 19- Lagast H et al.: Comparative study of the serum bactericidal activity of Cefoperazone alone and in combination with Amikacin or Mezlocillin against Gram-negative bacilli and Staphylococcus aureus, Infection, 12(3):190 (1984).
- 20- Lanao JM et al.: Influence of dose in the urinary excretion of Amikacin, Inter.J.Cli.Pharm.Therap.Toxicol., 22(10): 538 (1984).
- 21- Le Frock JL et al.: Amikacin levels in the human biliary tract, J.Cli.Pharmacol., 24:247 (1984).
- 22- Levine JF et al.: Amikacin resistant Gram-negative bacilli, correlation of occurrence with Amikacin use, J.Inf.Dis., 151(2):295 (1985).

- 23- Lorian V: Effect of low antibiotic concentrations on bacteria, effect of blood, plasma, serum and polymorphonuclear cells, in Antibiotics in Laboratory Medicine, Lorian V editor, 2.ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1.vol., 646 (1986).
- 24- Mulligan ME et al.: Impact of prolonged incubation on disk diffusion susceptibility tests results for Staphylococcus aureus, J.Cli.Microbiol., 25(5):840 (1987).
- 25- National Committee For Clinical Laboratory Standards, Approved Standard M7-A: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Villanova, Pa. (1985).
- 26- Parker MT: Staphylococcus and Micrococcus, in Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, Topley and Wilson ed., 7.ed., Edward Arnold, 2.vol., 219 (1984).
- 27- Pfaller MA et al.: Variations from standards in Staphylococcus aureus susceptibility testing, Am.J.Cli.Pathol., 88(2): 231 (1987).
- 28- Schleifer KH: Gram positive cocci, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Sneath PHA ed., Williams and Wilkins, 2.vol., 999 (1986).
- 29- Schoenknecht FD et al.: Susceptibility tests: special tests, in Manual of Clinical Microbiology, Lennette EH ed., 4.ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 1000 (1985).

- 30- Selli M: Die Wirkung des Adrenalins auf die Resistenzsteigerung von Staphylokokkus aureus bei Gentamicin, Med.Bull.Istanbul, 7:26 (1974).
- 31- Shanson DC: Multiple antibiotic resistant Staphylococci, in Proceedings of the First Middle East Symposium "Hospital Infection and its Control" held in Kuwait, 14th-16th November 1981, Sabri S and Tittenso JR ed., Barker Publication, 59 (1982).
- 32- Sheagren JN: Staphylococcus aureus: the persistent pathogen (second of two parts), N.Eng.J.Med., 310(22): 1437 (1984).
- 33- Shyu WC et al.: Effect of stress on the pharmacokinetics of Amikacin and Ticarcillin, J.Pharm.Sci., 76(3): 265 (1987).
- 34- Siegenthaler WE et al.: Aminoglycoside antibiotics in infectious diseases, Am.J.Med., 30(80) Suppl.6B :2 (1986).
- 35- Speck EL: Fever and fever of unknown etiology, in a practical approach to infectious diseases, Reese RE et al. ed., Little, Brown and Company, Boston, 1 (1983).
- 36- Storch GA, Krogstad DJ: Antibiotic induced lysis of enterococci, J.Cli.Invest., 58:639 (1981).
- 37- Stratton CW et al.: Effect of human serum on inhibition of growth of Staphylococcus aureus by antimicrobial agents, Eur.J.Cli.Microbiol., 5(3):351 (1986).
- 38- Tager M, Drummond MC: Staphylocoagulase, Ann.N.Y.Acad.Sci., 128:92 (1965).

- 39- Thrupp LD: Susceptibility testing of antibiotics in liquid media, in Antibiotics in Laboratory Medicine, Lorian V ed., 2.ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 646 (1986).
- 40- Weiner N: Norepinephrine, Epinephrine and the sympathomimetic amines, in Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman L and Gilman A ed., 6.ed., Mc Millan, USA, 138 (1980).
- 41- Wiseman GM: The hemolysins of Staphylococcus aureus, Bact. Rev., 39(4):317 (1975).





NORMAL EKİM MIC DEĞERLERİ (µg/ml)

Suş No.	GÜNLER				
	1	2	3	4	5
1	0.09	0.39	1.56	3.12	6.25
2	0.19	0.78	3.12	3.12	6.25
3	0.19	0.39	1.56	1.56	3.12
4	0.09	0.19	0.39	0.78	1.56
5	0.09	0.19	0.78	1.56	3.12
6	0.19	0.39	0.78	3.12	6.25
7	0.19	0.78	1.56	3.12	6.25
8	0.19	0.39	1.56	3.12	6.25
9	0.09	0.19	0.39	0.78	1.56
10	0.19	0.39	1.56	3.12	6.25
11	0.09	0.19	0.39	0.78	3.12
12	0.09	0.19	0.78	1.56	3.12

TABLO 1

125µg/ml ADRENALİNLİ EKİM MIC DEĞERLERİ(µg/ml)

Suş No.	GÜNLER				
	1	2	3	4	5
1	0.09	0.09	0.39	0.39	0.39
2	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39
3	0.09	0.09	0.39	0.39	0.39
4	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
5	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
6	0.09	0.19	0.19	0.19	0.19
7	0.09	0.19	0.19	0.19	0.19
8	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
9	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
10	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39
11	0.09	0.19	0.19	0.39	0.39
12	0.09	0.19	0.19	0.19	0.39

TABLO 2

125 ng/ml ADRENALİNLİ EKİM MIC DEĞERLERİ (µg/ml)

Suş No.	GÜNLER				
	1	2	3	4	5
1	0.09	0.09	0.39	0.39	0.39
2	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
3	0.09	0.09	0.39	0.39	0.39
4	0.09	0.19	0.19	0.19	0.39
5	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
6	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
7	0.09	0.19	0.19	0.39	0.39
8	0.09	0.19	0.19	0.39	0.39
9	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
10	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39
11	0.09	0.19	0.19	0.19	0.19
12	0.09	0.19	0.19	0.19	0.19

TABLO 3

12.5 ng/ml ADRENALİNLİ EKİM MIC DEĞERLERİ (µg/ml)

Suş No.	GÜNLER				
	1	2	3	4	5
1	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
2	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
3	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
4	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
5	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
6	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
7	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
8	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
9	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
10	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
11	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
12	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39

TABLO 4

125 pg/ml ADRENALİNLİ EKİM MIC DEĞERLERİ (µg/ml)

Suş No.	GÜNLER				
	1	2	3	4	5
1	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
2	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
3	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
4	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
5	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
6	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
7	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
8	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
9	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
10	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
11	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
12	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39

TABLO 5

12.5 pg/ml ADRENALİNLİ EKİM MIC DEĞERLERİ (µg/ml)

Suş No.	GÜNLER				
	1	2	3	4	5
1	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39
2	0.09	0.09	0.19	0.19	0.39
3	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39
4	0.09	0.09	0.19	0.19	0.39
5	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39
6	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
7	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
8	0.09	0.09	0.19	0.19	0.39
9	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
10	0.09	0.09	0.09	0.19	0.39
11	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39
12	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39

TABLO 6

125 µg/ml ADRENALİNLİ VE PLAZMALI EKİM MIC DEĞERLERİ (µg/ml)

Suş No.	GÜNLER				
	1	2	3	4	5
1	0.09	0.19	0.19	0.19	0.19
2	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
3	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
4	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
5	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
6	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
7	0.09	0.39	0.78	0.78	0.78
8	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
9	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
10	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
11	0.09	0.09	0.09	0.09	0.19
12	0.09	0.09	0.09	0.19	0.19

TABLO 7

125 ng/ml ADRENALİNLİ VE PLAZMALI EKİM MIC DEĞERLERİ (µg/ml)

Sus No.	GÜNLER				
	1	2	3	4	5
1	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
2	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
3	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
4	0.09	0.09	0.09	0.19	0.19
5	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
6	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
7	0.09	0.19	0.78	0.78	0.78
8	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
9	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
10	0.09	0.19	0.19	0.39	0.39
11	0.09	0.09	0.09	0.09	0.19
12	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19

TABLO 8

12.5 ng/ml ADRENALİNLİ VE PLAZMALI EKİM MIC DEĞERLERİ (µg/ml)

Suş No.	GÜNLER				
	1	2	3	4	5
1	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
2	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
3	0.09	0.19	0.39	0.39	0.78
4	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
5	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39
6	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
7	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
8	0.09	0.09	0.19	0.19	0.39
9	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
10	0.09	0.19	0.19	0.39	0.39
11	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39
12	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19

TABLO 9

125 pg/ml ADRENALİNLİ VE PLAZMALI EKİM MIC DEĞERLERİ (µg/ml)

Suş No.	GÜNLER				
	1	2	3	4	5
1	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
2	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
3	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
4	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
5	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
6	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
7	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
8	0.09	0.19	0.39	0.39	0.39
9	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
10	0.09	0.09	0.19	0.39	0.39
11	0.09	0.09	0.09	0.19	0.19
12	0.09	0.09	0.09	0.19	0.19

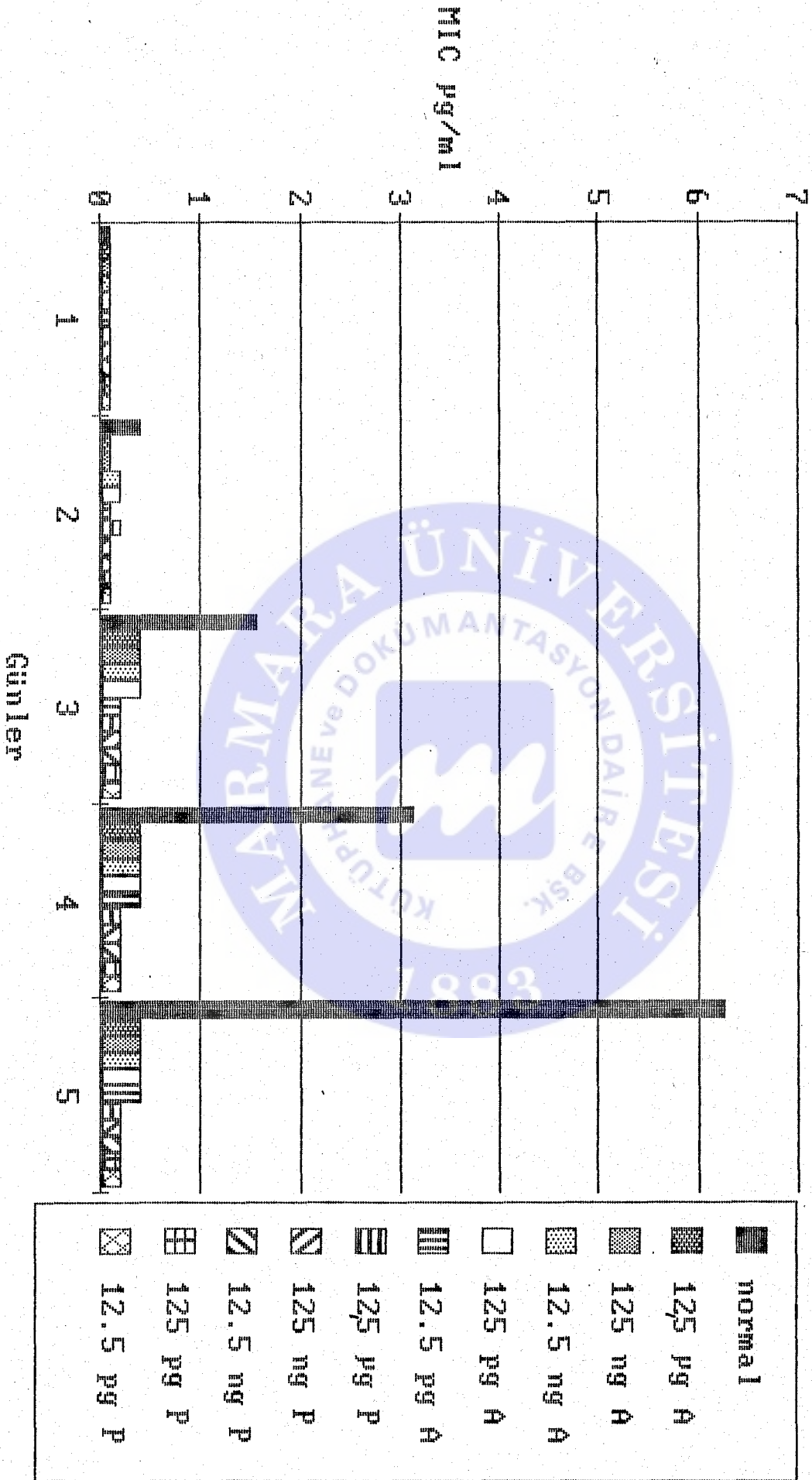
TABLO 10

12.5 pg/ml ADRENALİNLİ VE PLAZMALI EKİM MIC DEĞERLERİ (µg/ml)

Suş No.	GÜNLER				
	1	2	3	4	5
1	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19
2	0.09	0.09	0.09	0.19	0.19
3	0.09	0.09	0.09	0.19	0.19
4	0.09	0.09	0.19	0.19	0.39
5	0.09	0.09	0.10	0.39	0.39
6	0.09	0.09	0.19	0.19	0.39
7	0.09	0.19	0.39	0.78	0.78
8	0.09	0.19	0.19	0.39	0.39
9	0.09	0.09	0.09	0.19	0.19
10	0.09	0.09	0.19	0.19	0.39
11	0.09	0.09	0.09	0.09	0.19
12	0.09	0.09	0.19	0.19	0.19

TABLO 11

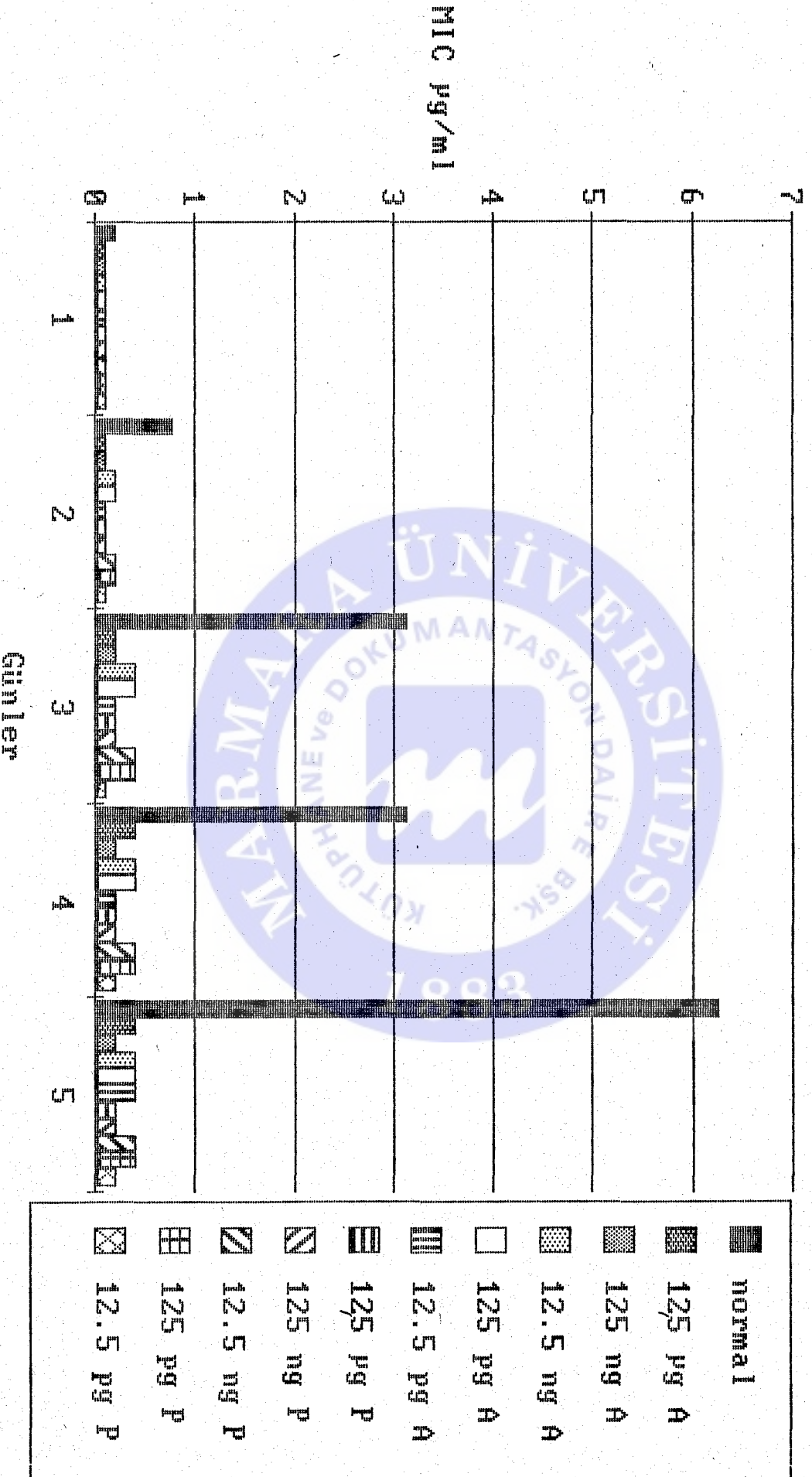
SUŞ 1



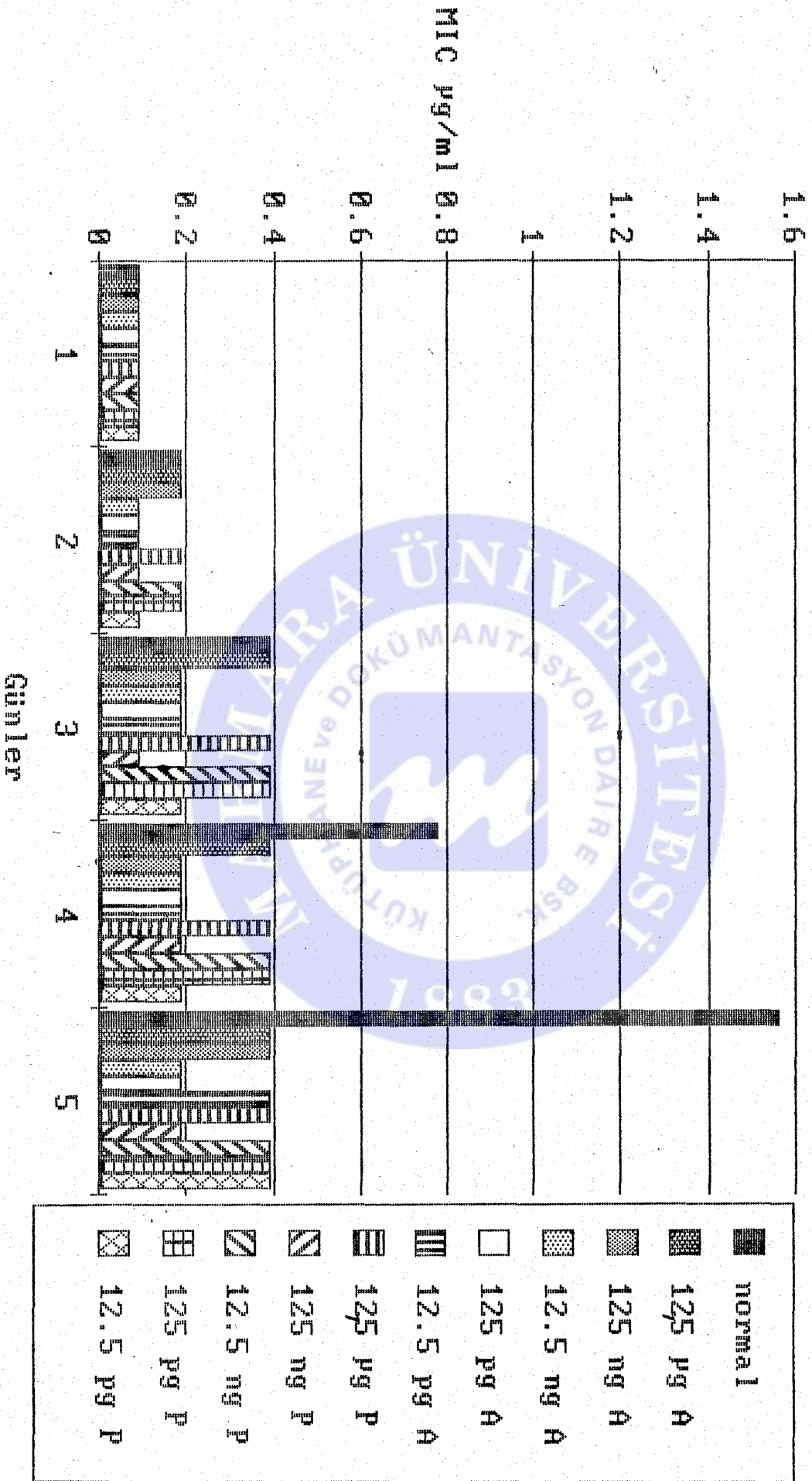
MIC µg/ml

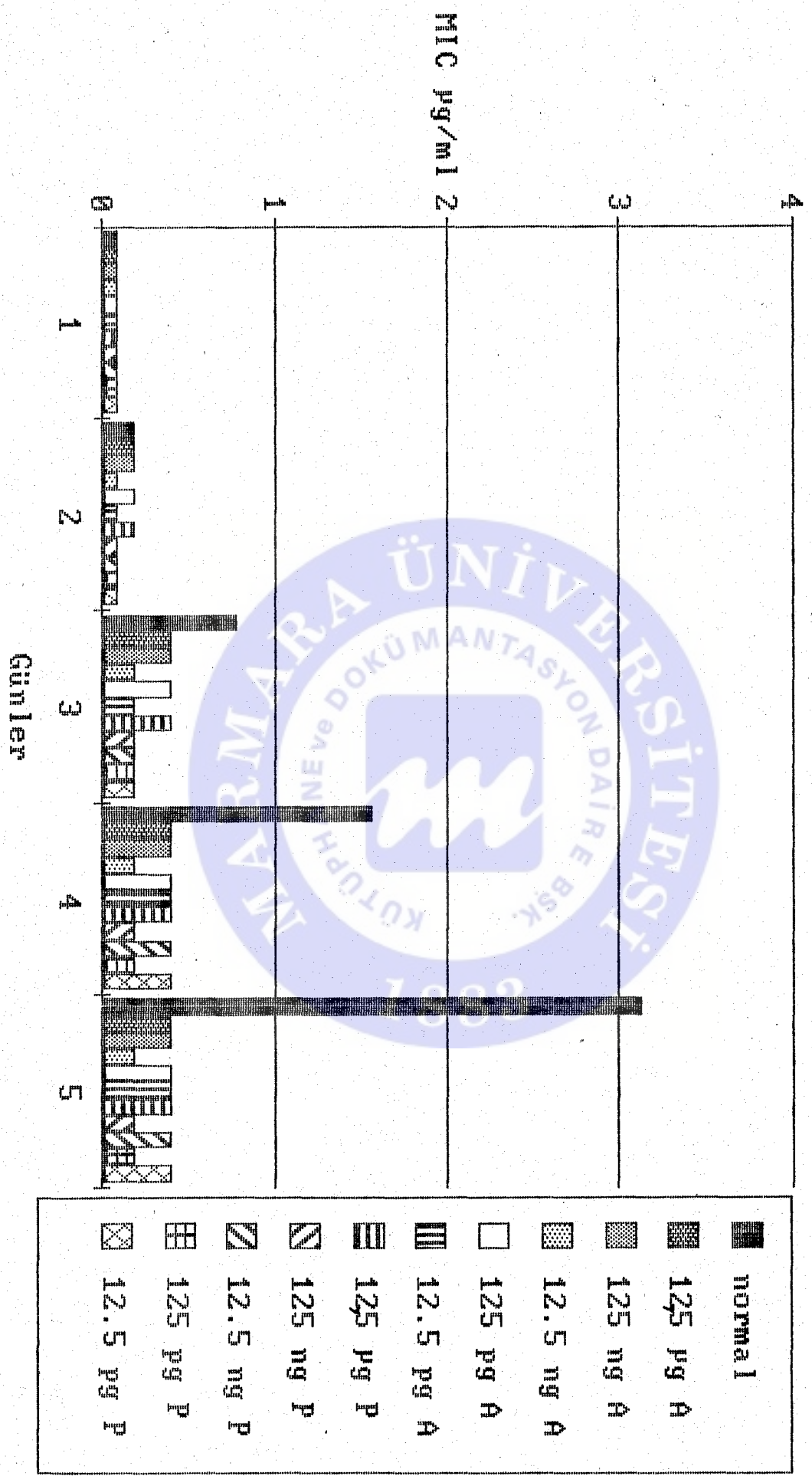
Günler

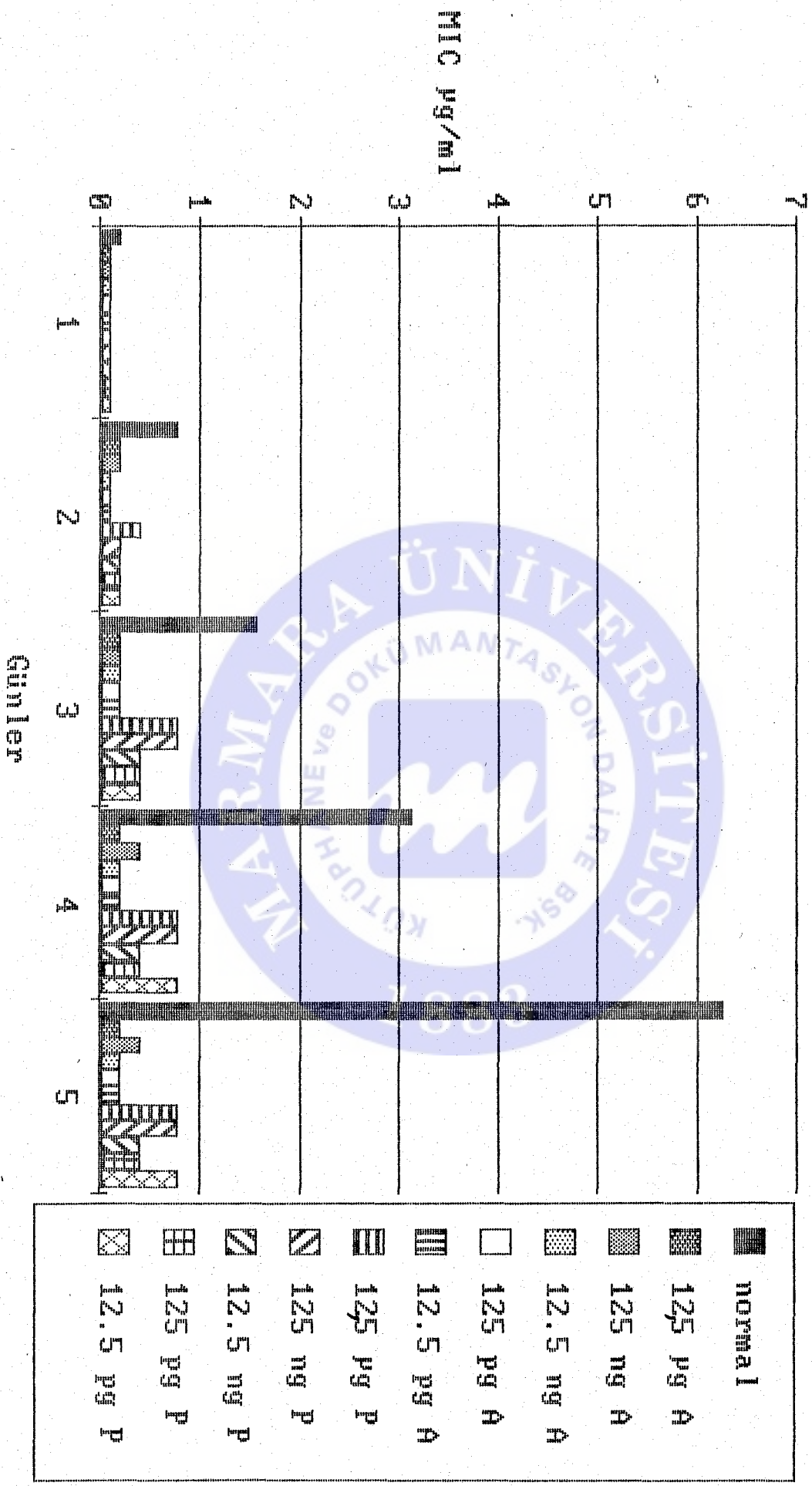
SUS 2



SUS 4







SUS 12 (ATCC 29231)

