

KLARİTROMİSİNİN STREPTOCOCCUS PYOGENES NCTC 8230 SUŞUNA KARŞI OLUŞTURDUĞU İN-VİTRO POSTANTİBİYOTİK ETKİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet ÖZBEK

ÖZET

Bakterilerin antimikrobiklere maruz kaldıktan sonra üremelerinde bir dönem için duraklamanın meydana gelmesi "Postantibiyotik etki" (PAE) olarak isimlendirilmiştir. Bu farmakodinamik parametre, her bir mikroorganizma-antibiyotik ikilisi için değişmektedir. PAE üzerinde etkili faktörlerden biri, antibiyotik konsantrasyonudur. Bu çalışmada *Streptococcus pyogenes* NCTC 8230 suşunda klaritromisin oluşturduğu PAE, antibiyotik konsantrasyonundaki değişmelere bağlı olarak incelenmiştir. Klaritromisinin denenen streptokok suşu için MIC değeri mikrotüp dilüsyon yöntemiyle 0.020 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu MIC değerinin 1,2,4,8,16,32,64 ve 128 katlarıyla logaritmik üreme dönemindeki bakteri inokulumu 90 dakika temas ettirilmiş, antibiyotik ortamdan 10 bin kat sulandırma ile uzaklaştırılmıştır. PAE değerinin 8xMIC katından sonra değişmediği görülmüştür.

SUMMARY

Investigation of in-vitro postantibiotic effect of clarithromycin against Streptococcus pyogenes NCTC 8230.

The suppression of bacterial growth that persist after brief exposure to antimicrobial agents has been termed "Postantibiotic effect" (PAE). This pharmacodynamic interaction varies for each microorganism-antimicrobial agent combination. Antimicrobial concentration is one of the effective factors on PAE. In this study, the PAE of clarithromycin on reference strain *Streptococcus pyogenes* NCTC 8230 in different concentrations of antibiotic was evaluated. The MIC of clarithromycin for test strain was determined as 0.020 mg/L by microdilution. Bacteria in logarithmic growth phase in brain heart infusion broth were exposed to different concentrations (1xMIC, 2xMIC, 4xMIC, 8xMIC, 16xMIC, 32xMIC, 64xMIC and 128xMIC) of the clarithromycin for 90 minutes. The antimicrobial agent was removed by diluting the culture 10,000 fold with fresh broth. It is observed that the PAE value did not increase in antimicrobial concentrations higher than 8xMIC.

GİRİŞ

Dünyada yaygın bir kullanıma sahip olan antibiyotikler, çoğunlukla irrasyonel olarak kullanılmaktadır. Yapılan bu hata; yan etkilerinin sık görülmesi, ekonomik yük ve bakteriyel direnç gibi birtakım sakıncaları da beraberinde getirmektedir.

Antibiyotiklerin optimal doz programlarının ayarlanmasında farmakodinamik parametreler gittikçe artan bir öneme sahiptir. Bu parametrelerden biri de PAE olup;

antibiyotiğin üremeyi durduran konsantrasyonlarına maruz bırakılan bir bakterinin, antibiyotik ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hemen, antibiyotiğe maruz kalmamış bakteri gibi üreyemeyip, üremesini bir süre için engelleyen, kalıcı antibiyotik etki olarak tarif edilir (19).

Birçok antibiyotik bakteri karşılaşmalarında antibiyotik ortamdan yok edilse de inhibisyon etkisi bir süre daha devam eder. Antibiyotiğe maruz kalan bakteri üremesinin, antibiyotikle temas etmemiş bakterinin üreme hızına erişmesi için bir süre geçmesi gerekir. PAE de bu süreyle ölçülen bir etkidir. Bu sebeple literatürde; “**kalıcı baskılayıcı etki**”, “**nekahat periyodu**”, “**post MIC etki**” gibi çeşitli deyimler de önerilmiştir. Ancak yaygın kullanılan deyim, “**Postantibiyotik etki**” olmuştur (6,11,19,23,24).

PAE’ye; bakterinin tipi, antimikrobiyal ajan, antimikrobiyal ajanın konsantrasyonu, antimikrobiyal ajana mikroorganizmanın maruz kalım süresi, bakterinin inokulum miktarı, kültür yapılan besiyeri, antibiyotik sonrası subminimum inhibitör konsantrasyonu etki etmektedir (19,26).

Daha önceki çalışmalarda klaritromisinin *Streptococcus pyogenes* NCTC 8230 suşuna karşı oluşturduğu PAE incelenmiş ve burada bakteri inokulumu antibiyotiğin artan konsantrasyonlarıyla muamele edilip, PAE süresindeki artış saptanmıştır (19). Bu çalışmada ise, PAE süresindeki artışın hangi antibiyotik konsantrasyonuna kadar olduğu araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Materyal:

a) Bakteri: Standart bir suş olan *S.pyogenes* NCTC 8230 suşu İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarlarından alınmıştır.

b) Besiyeri: Sıvı besiyeri olarak beyin kalp infüzyon buyyonu, katı besiyeri olarak da beyin-kalp infüzyon agarı kullanılmıştır.

c) Antibiyotik: Fako İlaç A.Ş. tarafından sağlanan aktif, saf, toz halinde klaritromisin kullanılmıştır.

Yöntem:

a) MIC tayini: Klaritromisinin *S.pyogenes* NCTC 8230 suşu için MIC değeri NCCLS kurallarına göre mikrotüp dilüsyon yöntemi ile saptanmıştır (3,19).

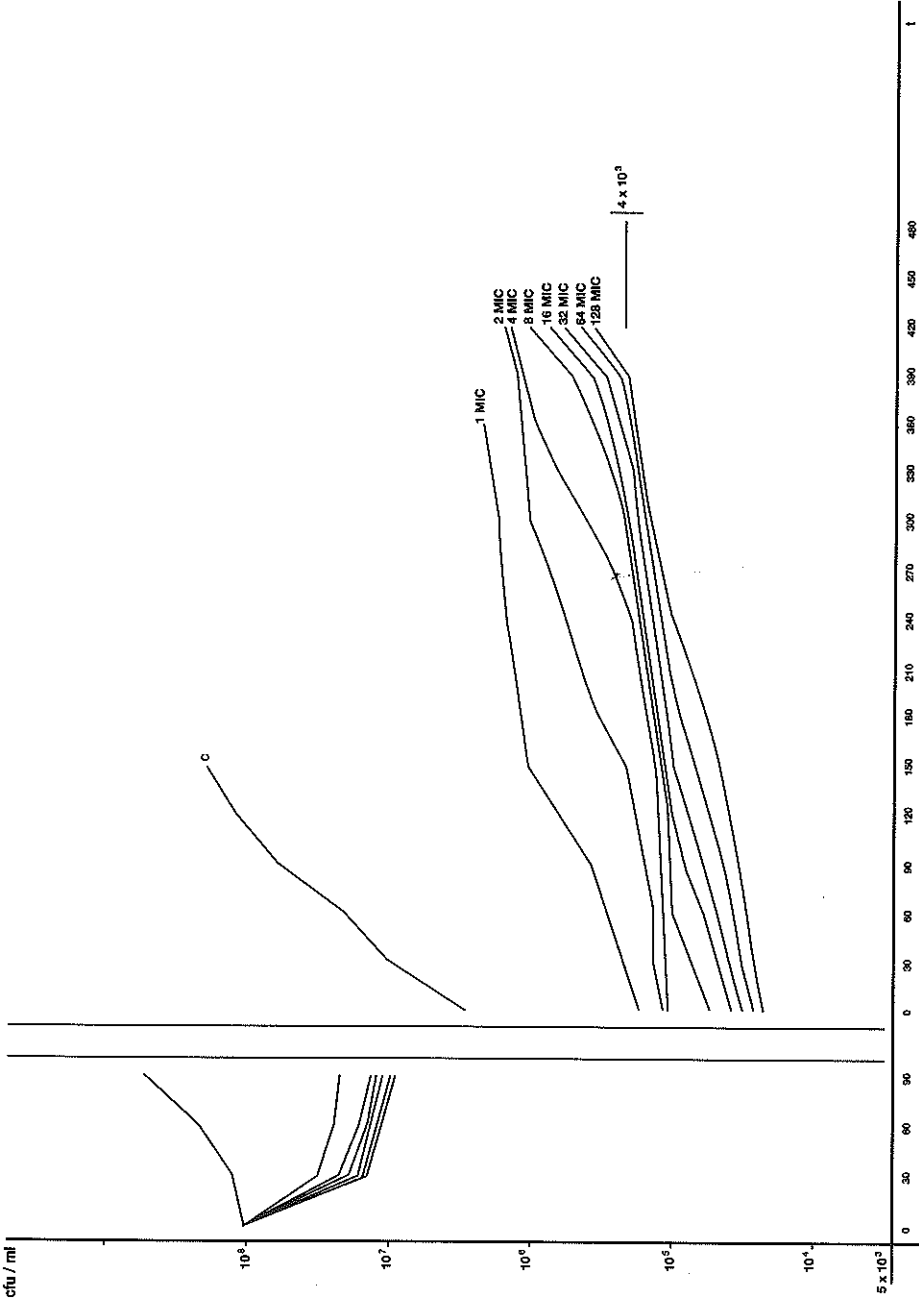
b) PAE’nin tayini: Sıvı besiyerinde saf olarak üretilen, 10^8 cfu/ml sayıda bakteri bulunduran, logaritmik üreme dönemindeki bakteri inokulumu kullanılmıştır (19,22). Bu inokulum 90 dakika süreyle, klaritromisinin 1xMIC, 2xMIC, 4xMIC, 8xMIC, 16xMIC, 32xMIC, 64xMIC ve 128xMIC konsantrasyonlarıyla çalkalama su banyosunda temas ettirilmiştir. Logaritmik üreme dönemindeki bir başka bakteri inokulumu da antibiyotikle temas ettirmeksizin aynı işlemlerden geçirilerek kontrol amacıyla kullanılmıştır.

Antibiyotikle muameleden sonra 10 bin kat sulandırılarak antibiyotik ortamdan uzaklaştırılmıştır (15,16,19). Antibiyotikten arındırılan inokulum çalkalama su banyosuna konularak her 30 dakikada bir katı besiyerinde bakteri sayımı yapılmıştır (19).

PAE; test ve kontrol kültürlerindeki bakteri sayısının 10 kat artması için gereken sürelerin farkıdır. Canlı bakteri sayımından elde edilen veriler grafik üzerinde gösterilerek PAE süreleri belirlenmiştir.

BULGULAR

Klaritromisin'in *S.pyogenes* NCTC 8230 suşuna karşı oluşturduğu PAE süresi şekilde gösterilmiştir.



Şekil 1. Klaritromisin'in artan MIC değerlerinde *S.pyogenes* NCTC 8230 suşuna oluşturduğu PAE süreleri.

TARTIŞMA

Klinikte tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklerde aranan ilk özellik, onların in-vivo ve in-vitro koşullarda bakteri üremesini baskılamasıdır. Antibiyotiklerin bakteri üremesine olan baskılayıcı etkileri bazı bakteri ve antibiyotikler için antibiyotik ortamdan uzaklaştırıldığında da bir süre için devam etmekte ve daha sonra bakteriler normal üreme dönemine geçmektedir. Başka bir deyişle; antibiyotiğe maruz kalmış bir bakterinin üreme hızının, antibiyotikle temas etmemiş bakterinin üreme hızına erişmesi için belirli bir süre geçmesi gerekmektedir. Bakteri üremesindeki bu gecikme en sık PAE olarak adlandırılmıştır (19).

PAE olayı ilk olarak 1940'lı yıllarda stafilokokların penisilinle muamelesinde görülmüş, daha sonra aynı olaylar beta-laktam antibiyotiklerle Gram pozitif koklar arasında da izlenmiştir. 1970'li yıllarda yapılan çalışmalar, antibiyotiğin ortamdan uzaklaştırılması için standart bazı yöntemlerin geliştirilmesini sağlamış, daha sonraki çalışmalar PAE süresinin belirlenmesinde in-vitro yöntemlerin yanı sıra in-vivo yöntemleri de gündeme getirmiştir (6,19,23,24,25,27).

In-vitro ve in-vivo yöntemlerle PAE süresinin belirlenmesine ait yöntemlerin bir çoğu, antibiyoterapide doz aralarının belirlenmesi üzerinde yoğunlaşmıştır (19).

In-vitro yöntemlerle PAE süresinin tayini; logaritmik üreme dönemindeki bakteri kültürünün MIC'in 1 ile 10 katı konsantrasyondaki antibiyotikle 1 ile 3 saat arasında muamele edilip daha sonra antibiyotiğin uzaklaştırılması, antibiyotiğin uzaklaştırıldığı andaki canlı bakteri sayısının 10 katına çıkması için geçen sürenin tespit edilmesi ve bu süreden, antibiyotikle temas etmemiş kontrol kültüründeki bakteri sayısının 10 kat artması için gereken sürenin çıkarılmasıdır (5,6,8,10,11,23,24,25,27).

PAE üzerine yapılan çalışmaların sonucunda bazı genellemeler yapılmıştır. PAE için antimikrobiyal etkinlik olmalıdır. PAE süresi antimikrobiyal konsantrasyonu ile olduğu kadar, antimikrobiyalın kullanıma başlamasından, en yüksek derecede yanıt alınması arasında geçen zamanla da ilişkilidir. Bu konuda sonuç olarak söylenebilecek söz "bir ilacın PAE oluşturma yeteneği, onun kendinde yer alan antimikrobiyal aktivite yeteneğine bağlıdır" şeklindedir (19).

Daha önceki çalışmalarda 14 üyeli bir makrolit olan klaritromisin streptokoklar üzerindeki PAE'si antibiyotiğin 0.5xMIC, 1xMIC ve 2xMIC konsantrasyonlarıyla araştırılmış ve bu grup ilaçların değişik mikroorganizma suşları için uzun PAE süresi oluşturdukları gözlenmiştir (19).

Bugüne kadar yapılmış olan birçok çalışmada orta ve hafif şiddetteki streptokok enfeksiyonlarına karşı kullanılan klaritromisinin, penisilinlere yakın bir değerde etki gösterdiği saptanmıştır (13). Bunun yanı sıra eritromisin, eritromisilamin, fluritromisin, diritromisin, azitromisin, josamisin, miokamisin, rokitamisin ile mukayese edildiğinde, *S.pyogenes*'e en etkili antibiyotik olarak gösterilmiştir (7). Klaritromisinin penisilin, ampicilin, amoksisilin, amoksisilin+klavulanik asit, klindamisin, vankomisin, tetrasiklin, sefalotin, sefiksime, sefotaksim, sefaklor, sefuroksim aksetil, trimetoprim, sulfametoksazol ve kotrimoksazol ile mukayese edildiği birkaç çalışma da aynı durumu desteklemektedir (1,2,13,14). Bu sonuçlar bize, klaritromisinin hafif ve orta dereceli üst ve alt solunum yolu enfeksiyonlarında iyi bir alternatif, hatta belki de, bazı durumlarda ilk seçilecek ilaç olabileceğini göstermektedir.

PAE bakterilerde birçok antibiyotik için geçerli olan bir özelliktir. Bu özelliği değerlendirmede etkili olan birtakım faktörler vardır. Bu faktörlerden en önemlileri;

bakteri inokulumuyla temas eden antibiyotiğin konsantrasyonu ve bu temasın süresidir (19). PAE'nin her bakteri suşu için ayrı ayrı değerlendirilmesi gerekmektedir. Yapılan birçok araştırma; PAE'deki konsantrasyona bağlı artışın belirli bir yere kadar olduğunu göstermiştir. Antimikrobiyalde bundan sonraki artışlar PAE için herhangi bir değişiklik sağlamamıştır. Ancak bu kurala aykırı davranan rifampin, Gram pozitif mikroorganizmalarda konsantrasyon arttıkça daha fazla PAE süreleri göstermiştir (8). Mikroorganizmaların, değişik sürelerde belirli antibiyotik konsantrasyonlarına maruz kaldığında da benzer sonuçların alındığını gösteren yayınlar vardır. Burada sabit olan antibiyotik konsantrasyonu, değişken olan ise, antibiyotikle temas süresidir (8). Yapılan bir diğer çalışmada da antimikrobiyal konsantrasyonu ve maruz kalım süresi bir antibiyotiğin PAE'sini saptamak için eşit derecede önemlidir denmektedir (26).

Biz önceki çalışmamızda temas süresini sabit tutarak artan konsantrasyonla PAE süresi arasındaki ilişkiyi inceledik. Artan antimikrobiyal konsantrasyonu ile birlikte PAE süresinin de arttığını gördük (19). Burada ise, PAE süresindeki bu artışın hangi konsantrasyona kadar olduğunu ve bu konsantrasyondaki PAE süresini belirlemeyi amaçladık. Önceki çalışmada standart *S.pyogenes* suşu için (MIC=0.020 mg/L) 0.5xMIC'de PAE süresi 174 (±5) dakika, 2xMIC'de 284 (±5) dakika olduğunu belirlemiştik. Çalıştığımız diğer klinik izolatların bir grubunda (MIC=0.090 mg/L)'de 0.5xMIC için PAE süresi 187 (±5) dakika, 2xMIC için PAE süresi 337 (±5) dakika ve diğer grupta (MIC=0.140 mg/L)'de 0.5xMIC için PAE süresi 204 (±5) dakika ve 2xMIC için 355 ± 5 dakika olarak bulunmuştur. Gruplar arasında PAE sürelerinde az da olsa bir artış olduğunu gözlemiş ve bu artışın MIC değerindeki artışla ilgili olabileceği gibi, subinhibitör konsantrasyonların farmakodinamik etkilerine de bağlı olabileceğini düşünmüştük (19). Benzil penisilinin in-vitro postantibiyotik fazdaki *S.pyogenes* suşuna etkisini araştıran bir çalışmada, MIC değerinin çok altındaki antimikrobiyal konsantrasyonları normal organizmalarda önemli bir etki göstermezken, postantibiyotik fazdaki organizmalarda üremede dikkate değer ölçüde gecikmelere yol açmıştır (16). Aynı doğrultuda yapılmış bir diğer çalışmada amikasin, vankomisin, roksitromisin ve sparfloksasinin postantibiyotik sub-MIC etkileri incelenmiştir (17). Postantibiyotik fazda sub-MIC etkiyi yine benzer birçok çalışmada da görmekteyiz (4,12,18). Biz de bu çalışmamızda subinhibitör etkileri daha da aza indirmek için antibiyotiğin ortamdan uzaklaştırılmasında kullanılan yöntemlerden biri olan yıkama yöntemini 1000 kez sulandırılarak değil de (19), 10 bin kez sulandırılarak kullandık.

Antibiyotik kullanımından sonra, bakteri üremesindeki baskılanmanın yanı sıra başka olguların da görülebileceği gösterilmiştir. Postantibiyotik dönemde metabolik etkinliğin baskılanması, nükleik asit ve protein sentezinin baskılanması, bu olgular arasında sayılabilir. Ancak belki de en önemlisi, bakteri toksisitesinin baskılanıp baskılanmadığıdır (8). Ancak bu konuda henüz yeterli çalışma yoktur.

Çalışmalarımızda ve benzer amaçla yapılan diğer bazı çalışmalarda antibiyotiklerin optimal doz programlarının ayarlanmasında postantibiyotik etki, postantibiyotik sub-MIC etki ve sub-MIC etki gibi farmakodinamik parametrelerin önemli olduğu görülmüştür (9,18,20). Bu çalışmanın PAE sonuçlarını, diğer çalışmalarını da dikkate alarak (19), doz rejiminin ayarlanması yönünden olumlu olarak görmekteyiz. Standart *S.pyogenes* suşu için bakteriyi 90 dakika boyunca MIC değeriyle muamele sonucunda yaklaşık 4 saatlik bir PAE süresi gözlenmiştir. Bu süre 2xMIC'de yaklaşık 5 saat olmuştur. Ancak MIC değerinde daha sonraki artışlar PAE süresini fazlaca değiştirmemiş ve 8xMIC antibiyotik konsantrasyonundan itibaren de

PAE sürelerinde artan MIC değerlerine rağmen artma olmamıştır. Bu bize ilacın normal pozolojisine uygun kullanıldığında ulaşacağı in-vivo kan konsantrasyonu MIC değerinin altına düştüğünde de, yaklaşık 5 saat süreyle, ilacın etkinliğini sürdüreceğini göstermektedir. Fakat unutmamak gerekir ki, elde ettiğimiz sonuçlar in-vitro bir çalışmanın sonuçlarıdır. İn-vivo olarak bu sonuçların yorumu, bütün klinik durumlarda ilacın yoğunluğa bağlı öldürücü etkisi ve farmakokinetik profili gibi farmakodinamik özellikleri antimikrobiyal etkinliği belirleyen ana etmenlerdir. Bugün için tüm bu çalışmalar ancak aminoglikozitler için netlik kazanmıştır (9,20,21,26).

Bu ve önceki çalışmalarımızla klaritromisin A grubu beta-hemolitik streptokoklar için önemli bir PAE süresinin olduğu saptanmıştır. Bu sürenin, ilacın pozolojisi yönünden hasta uyumunun sağlanmasında ve tedavi maliyetinin düşürülmesinde olumlu katkı yapacağı düşünülebilir.

KAYNAKLAR

- 1- Barry LA, Thornsberry C, Jones NR: In vitro activity of new macrolide A-56268, compared with that of roxithromycin, erythromycin, and clindamycin, *Antimicrob Agents Chemother* 31: 343 (1987).
- 2- Benson C, Segreti J, Kessler H, Hines D, Goodman L, Kaplan R, Trenholme G: Comparative in vitro activity of A-56268 (TE-031) against gram-positive and gram-negative bacteria and Chlamydia trachomatis, *Eur J Clin Microbiol* 6: 173 (1987).
- 3- Beşe M: *Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri*, Kardeşler Yayın Basımevi, İstanbul (1989).
- 4- Chin NX, Huang HB, Neu HC: Postantibiotic effect of ceftibuten on respiratory pathogens, *Pediatr Infect Dis J* 14 (Suppl): S 84 (1995).
- 5- Craig WA, Ebert SC: Killing and regrowth of bacteria in vitro: a review, *Scand J Infect Dis* 74: 63 (1991).
- 6- Craig WA, Vogelmann B: The postantibiotic effect, *Ann Intern Med* 106: 900 (1987).
- 7- Dwight JH, Dena MH, Jill MB, Charlene V, Edith JM, Prabhavathi BF: Comparative in vitro activities of new 14-, 15-, and 16- membered macrolides, *Antimicrob Agents Chemother* 23: 1710 (1988).
- 8- Gerber UA: Postantibiotik etki ve klinikteki yeri, *Enfeksiyon Hastalıkları Gündemi* 1: 19 (1994).
- 9- Grimwood K, Abbott GD, Fergusson DM: Single dose gentamicin treatment of urinary infection in children, *NZ Med J* 101: 539 (1988).
- 10- Gudmundsson S, Erlendsdottir H, Gottferdsson M, Gudmundsson A: The postantibiotic effect induced by antimicrobial combinations, *Scand J Infect Dis* 74 (Suppl): 80 (1991).
- 11- Hanberger H: Pharmacodynamic effects of antibiotics. Studies on bacterial morphology, initial killing, postantibiotic effect and effective regrowth time, *Scand J Infect Dis* 81: 1 (1992).
- 12- Hostacka A: Postantibiotic effects and postantibiotic effect of subinhibitory levels of quinolones on Pseudomonas aeruginosa, *Epidemiol Microbiol Immunol* 15: 56 (1996).
- 13- Levenstein JH: Clarithromycin versus penicillin in the treatment of streptococcal pharyngitis, *J Antimicrob Chemother* 27 (Suppl A): 67 (1991).
- 14- Karaaslan Y: Bir ilaç değerlendirmesi: Klaritromisin, *İlaç ve Tedavi Derg* 5: 629 (1992).
- 15- Minguez F, Ramos C, Barrientos S, Loscos A, Prieto J: Postantibiotic effect of ciprofloxacin compared with that of five other quinolones, *Chemotherapy* 37: 420 (1991).
- 16- Orenholt I, Holm SE, Cars O: Effects of benzylpenicillin on Streptococcus pyogenes during the postantibiotic phase in vitro, *J Antimicrob Chemother* 24: 147 (1989).

- 17- Odenholt-Tornqvist I, Lowdin E, Cars O: Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of roxithromycin, clarithromycin, and azithromycin on respiratory tract pathogens, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 221 (1995).
- 18- Odenholt-Tornqvist I, Lowdin E, Cars O: Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin, and amikacin, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1852 (1992).
- 19- Özbek A: Klaritromisinin A grubu beta hemolitik streptokoklara karşı postantibiyotik etkisi, *Doktora Tezi*, Atatürk Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum (1996).
- 20- Powel SH, Thompson WL, Luthe MA, Stern RC, Grossniklaus DA, Borxham DD, Groden DL, Jacobs MR, Discenna AO, Cash HA, Klinger JD: Once-daily vs. continuous aminoglycoside dosing: efficacy and toxicity in animal and clinical studies of gentamicin, netilmicin, and tobramycin, *J Infect Dis* 147: 918 (1983).
- 21- Richard BD, Gregory MS: Single dose aminoglycoside treatment, *Infect Dis Clin Pract* 1: 5 (1996).
- 22- Scaglione F, Dugnani S, Demartini G, Scandelli M, Galmozzi G, Fraschini F: The postantibiotic effect of clarithromycin and its major human metabolite, 14-hydroxyclearithromycin, *J Antimicrob Chemother* 32: 507 (1993).
- 23- Töreci K: Antibiyotik sonrası etki (ASE), "Çalangu S, Eraksoy H, Özsüt H (eds): *İnfeksiyon Hastalıkları 92*" kitabında s.241, Yüce Yayınları, İstanbul (1992).
- 24- Töreci K: Postantibiyotik etki ve bakterilerde antibiyotiklere karşı tolerans, *ANKEM Derg* 7: 196 (1993).
- 25- Vogelmann BS, Craig WA: Postantibiotic effects, *J Antimicrob Chemother* 15 (Suppl A): 37 (1985).
- 26- Zhanel GG, Craig WA: Pharmacokinetic contributions to postantibiotic effects: focus on aminoglycosides, *Clin Pharmacokinet* 24: 377 (1994).
- 27- Zhanel GG, Hoban DJ, Harding GKM: The postantibiotic effect: a review of in vitro and in vivo data, *DICP Ann Pharmacother* 25: 153 (1991).