

ÜÇ AYRI FLOROKİNOLON SUBMİNİMAL İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARININ STANDARD BİR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* KÖKENİ VIRÜLANS ETMENLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ*

Meltem UÇAR, Hüseyin BASKIN, Yavuz DOĞAN, Sevin KIRDAR, İ.Hakkı BAHAR

ÖZET

Antibiyotiklerin subminimal inhibitör konsantrasyonlarının (sub-MİK) saptanması ve antibiyotiklerin sub-MİK düzeyinde virülans etmenlere etkileri infeksiyonların sağaltımında önemli kriterleri oluşturmaktadır.

Bu çalışmada siprofloksasin, levofloksasin ve ofloksasinin MİK ve sub-MİK değerlerinde; standart *Staphylococcus aureus* kökeninin üremesi ve virülans etmenlerinden hemoliz ve koagülaz üzerine etkileri değerlendirilmiştir. MİK değerleri; siprofloksasin için 0.5 µg/mL, levofloksasin için 0.5 µg/mL, ofloksasin için 1 µg/mL bulunmuştur. Bu MİK ve 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 x MİK değerlerinde bakterinin koloni sayımı, hemoliz ve tüp koagülaz testi yapılmıştır. Sonuç olarak stafilokoksik infeksiyonların sağaltımında her üç florokinolonun bakterinin üremesi, virülans etmenlerinden hemoliz ve koagülaz üzerine etkisinin sub-MİK değerlere inildiğinde hızla kaybolduğu gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Sub-MİK, *S.aureus* virülans etmenleri, kinolonlar

SUMMARY

Effects of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on the virulence factors of Staphylococcus aureus.

Detection of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics and the effects of these concentrations on the virulence factors of bacteria are significantly important in the treatment of infections.

The aim of this study is to investigate the effects of ciprofloxacin, levofloxacin, ofloxacin's MIC and sub-MIC concentrations on the growth and virulence factors of standart *S.aureus* strain. MIC values were 0.5 µg/mL for ciprofloxacin and levofloxacin, 1 µg/mL for ofloxacin. We evaluated the colony counting, hemolysis, and coagulase reactions in the MIC and 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 x MIC concentrations. On the standart *S.aureus* strain; these three quinolones's effects have decreased immediately at the sub-MIC levels.

Key words: Sub-MIC, *S.aureus* virulence factors, quinolones

GİRİŞ

İnsan ve hayvanların ağız ve nazofarinks floralarında bulunan *Staphylococcus aureus*, hem hastane hem de toplum kaynaklı birçok infeksiyonda sıklıkla etken olarak karşımıza çıkmaktadır (2). Özellikle doku infeksiyonlarının sağaltımında kullanılan antibiyotiklere hızla direnç kazanması bu bakterinin önemli patojenler arasında yer almasının nedeni olarak gösterilmektedir (1). İnfeksiyon hastalıklarının sağaltımında etkili seçenekler oluşturabilmek için kullanılacak antibiyotiklerin etken mikroorganizma üzerine olan bakteriyosidal ve bakteriyostatik etkisinin araştırılması gerekmektedir. Bu-

nun için çeşitli in-vitro testler uygulanmaktadır. Bu testler arasında antibiyotiklerin subminimal inhibitör konsantrasyonlarının (sub-MİK) saptanması ve antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarda virülans etmenleri üzerine etkileri önemli yer tutmaktadır (4,10).

Bu çalışmada siprofloksasin, levofloksasin ve ofloksasinin MİK ve sub-MİK değerlerinde, standart *Staphylococcus aureus* kökeninin üremesi ve virülans etmenlerinden hemoliz ve koagülaz üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

*XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur (30 Eylül - 5 Ekim 2002, Antalya).

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada standart *S.aureus* ATCC 25923 kökeni kullanılmıştır. Siprofloksasin, Bayer; levofloksasin ve ofloksasin, Hoechst Marion Roussel firmasından temin edilmiştir. Antibiyotiklerin stok çözeltileri distile suda hazırlanmış, buzdolabında +4°C'de saklanmış, deneylerde istenilen son konsantrasyonda olacak şekilde besiyerlerine ilave edilmiştir.

MİK saptanmasında NCCLS standartlarına uygun bir tüp dilüsyon yöntemi uygulanmıştır (8). Bunun için katyonu ayarlı Mueller-Hinton sıvı besiyeri (CAMHB) kullanılmıştır. Deneyler bu MİK değerleri dikkate alınarak yapılmıştır.

S.aureus kökeninin kanlı jeloz besiyerindeki bir gecelik saf kültüründen 3 mL Mueller-Hinton sıvı besiyeri içerisinde son konsantrasyonu 0.5 McFarland olacak biçimde süspansiyon hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonu; biri kontrol olarak antibiyotiksiz besiyeri, altısı MİK, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 x MİK olarak seri dilüsyonu içeren toplam yedi tüpe 0.5 mL

ilave edilmiştir. Belirtilen konsantrasyonlar antibiyotikli besiyeri ve inokulum karıştırıldığında varılan son konsantrasyonlardır.

37°C'de 24 saatlik inkübasyonun sonunda her tüpten 10 µL alınarak iki adet kanlı jeloz besiyerine kantitatif ekimleri yapılmıştır. Besiyerlerinin 37°C'de 24 saatlik inkübasyonu sonrası koloni sayımları yapılmıştır.

Hemoliz özelliği; süspansiyondan 10 µL emdirilmiş Whatman No: 1 kâğıdıyla, koagülaz aktivitesi ise tüpte koagülaz yöntemi ile değerlendirilmiştir. Tüpler; ilk dört saatte 37°C derecelik etüvde tutulmuş ve her yarım saatte bir çıkarılarak sonuçları kaydedilmiştir.

Pozitif kontrol için Mueller-Hinton sıvı besiyeri ve bakteri süspansiyonu, negatif kontrol için Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılmıştır.

BULGULAR

MİK değerleri; siprofloksasin için 0.5 µg/mL, ofloksasin için 1 µg/mL, levofloksasin için 0.5 µg/mL bulunmuştur. Bu MİK değerleri ve 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 x MİK değerlerinin virülans etmenlerine ve bakterinin üremesine etkisi araştırılmıştır.

Üç ayrı florokinolonun sub-MİK değerlerde *S.aureus* kökeni virülans etmenleri üzerine etkilerinin sonuçları tabloda sunulmuştur. Pozitif kontrolde koloni sayısı 10⁵, hemoliz pozitif, tüp koagülaz 30 dakikada pozitif, negatif kontrolde hepsi negatif bulunmuştur.

Siprofloksasinin MİK düzeyinde koloni sayısının 5x10⁴ koloni/mL, hemoliz özelliğinin negatif ve tüpte koagülaz testinin 240. dakikada pozitifleştiği bulunurken; sub-MİK değerlere inildiğinde koloni sayısının 10⁵ koloni/mL'e çıktığı, hemoliz özelliğinin pozitifleştiği, tüpte koagülaz testinin da-

ha erken zamanlarda pozitifleştiği gözlenmiştir.

Levofloksasinin MİK düzeyinde koloni sayısının 10⁴ koloni/mL, hemoliz özelliğinin ve tüpte koagülaz testinin negatif olduğu bulunurken; sub-MİK değerlere inildiğinde siprofloksasinle benzer sonuçlar alınmıştır.

Ofloksasin için bulunan sonuçlar; MİK düzeyinde siprofloksasinle benzer şekilde 5x10⁴ koloni/mL, hemoliz ve tüp koagülaz sonuçları ise levofloksasinle benzer şekilde negatif bulunurken, sub-MİK değerlere inildiğinde diğer iki florokinolonla benzer sonuçlar alınmıştır.

Stafilokoksik infeksiyonların sağaltımında her üç florokinolonun bakterinin üremesi ve virülans etmenlerinden koagülaz ve hemoliz üzerine etkisinin, in-vitro koşullarda sub-MİK değerlere inildiğinde hızla kaybolduğu gözlenmiştir.

Tablo. Üç ayrı florokinolonun sub-MİK değerlerde *S.aureus* kökeninin üreme ve virülans etmenleri üzerine etkileri.

Konsantrasyon	Siprofloksasin			Levofloksasin			Ofloksasin		
	K.S.*	H.	T.K.	K.S.	H.	T.K.	K.S.	H.	T.K.
MİK	5X10 ⁴	-	+ (240 dak)	10 ⁴	-	-	5x10 ⁴	-	-
1/2 MİK	10 ⁵	+	+ (90 dak)	10 ⁵	+	+ (90 dak)	10 ⁵	+	+ (90 dak)
1/4 MİK	10 ⁵	+	+ (60 dak)	10 ⁵	+	+ (60 dak)	10 ⁵	+	+ (60 dak)
1/8 MİK	10 ⁵	+	+ (60 dak)	10 ⁵	+	+ (60 dak)	10 ⁵	+	+ (60 dak)
1/16 MİK	10 ⁵	+	+ (30 dak)	10 ⁵	+	+ (30 dak)	10 ⁵	+	+ (60 dak)
1/32 MİK	10 ⁵	+	+ (30 dak)	10 ⁵	+	+ (30 dak)	10 ⁵	+	+ (30 dak)

* mL'deki koloni sayısı, H: Hemoliz, T.K.: Tüp koagülaz.

TARTIŞMA

İnfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler mikroorganizmanın gelişmesini durdurarak veya onları öldürerek etkili olurlar. Bakterinin üremesini inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu olan MİK, biyolojik bir ölçüttür ve kesinlik göstermez. Sağaltımda esas alındığında ise antibiyotik-bakteri arasındaki etkileşimler konusunda bilgi vermediği gibi sub-MİK etkisini de hesaba katmaz (4,10).

Kinolon grubu antibiyotikler gerek hastane gerekse toplum kökenli infeksiyonların tedavisinde yaygınlığı giderek artan antimikrobiyal ajanlardır. Kinolonlar konsantrasyon bağımlı bakterisidal etkili olup mikroorganizmada DNA sentezini inhibe ederek etki gösterirler (3).

Kinolonların sub-MİK değerlerde de etkili olduğu birçok in-vitro çalışmada gösterilmiştir. Ryan ve ark. (9)'nın yaptığı çalışmada levofloksasin ve siprofloksasinin metisilin duyarlı ve metisilin dirençli *S.aureus* üzerindeki antibiyotik sonrası sub-MİK etkisinde bizim çalışmamızla uyumlu olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bunun yanı sıra Licata ve ark. (6), levofloksasin ve siprofloksasinin *S.aureus* ve *Streptococcus pneumoniae* üzerindeki antibiyotik sonrası sub-MİK etkisini araştırmışlar: *S.aureus* üzerinde 1/2 x MİK dü-

zeyinde levofloksasinin antibiyotik sonrası etkisinin daha uzun olduğunu ancak yine aynı sub-MİK değerinde *S.pneumoniae* üzerindeki etkilerinin eşit olduğunu saptamışlardır. Minguez ve ark. (7) ise siprofloksasinin antibiyotik sonrası etkisini farklı beş florokinolon (norfloksasin, ofloksasin, pefloksasin, fleroksasin, lomefloksasin) ile kıyaslamış ve siprofloksasinin en düşük MİK değere sahip olduğunu ve bakterisidal etkisinin en güçlü olduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmada ofloksasinin siprofloksasin ve levofloksasine kıyasla MİK düzeyinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak her üç florokinolonun bakterinin üremesi ve virülans etmenlerinden koagülaz ve hemoliz üzerine etkisinin in-vitro koşullarda sub-MİK değerlere inildiğinde hızla kaybolduğu gözlenmiştir. Özellikle stafilokoksik doku infeksiyonlarının sağaltımında bu sonuçların önemli olduğunu ve göz önünde tutulması gerektiğini düşünmekteyiz.

Antibiyotiklerin sub-MİK düzeylerinde bakteriler üzerine etkili olabilmesi, özellikle terapötik dozları birbirine yakın olan antibiyotiklerle en uygun doz ve doz aralığının saptanmasını sağlayacak yeni sağaltım stratejilerinin geliştirilmesi yönünden de önemlidir.

KAYNAKLAR

- 1- Birteksöz AS, Ötük G: Eritromisin, azitromisin ve klaritromisin Staphylococcus aureus suşları üzerine antibiyotik sonrası etkilerinin araştırılması, *ANKEM Derg* 15:11 (2001).
- 2- Değerli K, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S, Sezgin C, Kurutepe S: Klinik örneklerden soyutlanan Staphylococcus aureus suşlarının çeşitli antimikrobiklere duyarlılıkları, *İnfeksiyon Derg* 14:87 (2000).
- 3- Jacob LS: *The National Medical Series for Independent Study*, 3. baskı, s. 280 (1992).
- 4- Kaygusuz A, Töreci K: Çeşitli antibiyotiklerin subminimal inhibitör konsantrasyonlarının çeşitli bakteriler üzerine etkileri: 2. Siprofloksasin ile alınan sonuçlar, *ANKEM Derg* 8:378 (1994).
- 5- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenber PC: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5. baskı s. 551, JB Lippincott, Philadelphia (1997).
- 6- Licata L, Smith C E, Goldsmith R M, Barret J F, Frosco M: Comparison of the postantibiotic and postantibiotic sub-MIC effects of levofloxacin and ciprofloxacin on Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae, *Antimicrob Agents Chemother* 41:950 (1997).
- 7- Minguez F, Rmos C, Barrientos S, Lascos A, Prieto J: Postantibiotic effect of ciprofloxacin compared with that of five other quinolones, *Chemotherapy* 37:420 (1991).
- 8- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, NCCLS Document no. M7-A3, NCCLS, Villanova (1993).
- 9- Ryan BM, Mazzucco CE, Lawrence LE, Ho H, Warr G: Comparison of the Des-F(6)-quinolone BMS-284756, levofloxacin and ciprofloxacin against methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus, *J Clin Microbiol Infect Dis* 21:27 (2002).
- 10- Töreci K, Kaygusuz A: Çeşitli antibiyotiklerin subminimal inhibitör konsantrasyonlarının çeşitli bakteriler üzerine etkileri: 1. Amikasin ile alınan sonuçlar, *ANKEM Derg* 8:368 (1994).