

# S.AUREUS, P.MIRABILIS, S.TYPHIMURIUM SUŞLARINA AMOKSİSİLİN, KLAVULANİK ASİT VE AMOKSİSİLİN+KLAVULANİK ASİT KOMBİNASYONUNUN ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Asadollaeh MAMAGANI-BONABY, Kurtuluş TÖRECİ

## ÖZET

101 *S.aureus*, 50 *P.mirabilis* ve 30 *S.typhimurium* suşunun tüp dilüsyon yöntemi ile amoksisiline, klavulanik asit ve amoksisilin+klavulanik asit (2/1) kombinasyonuna (Augmentin'e); disk difüzyon yöntemi ile amoksisiline ve kombinasyona duyarlıkları deneyerek amoksisilin bu suşlara etkinliğinin klavulanik asit tarafından ne oranda artırıldığı araştırılmıştır.

*S.aureus* suşlarının % 90'ı 25 µg/ml amoksisilin ile inhibe edilmişken, 6.25 µg/ml amoksisilin içeren kombinasyonla bu sonuç alınmıştır. Klavulanik asit amoksisilin MİK'unu 75 suшта düşürmüş, 20 suшта etkilememiş, 6 suş değerlendirilememiştir. Klavulanik asidin *S.aureus* suşlarına amoksisilin etkinliğini artırışı genellikle yüksek düzeyde olmamış, daha çok orta duyarlı suşların duyarlı sınırına kayması şeklinde belirmiştir.

*P.mirabilis* suşlarının çoğunluğuna klavulanik asit amoksisilinden daha etkili bulunmuştur. Duyarlık sınırı 8 µg/ml amoksisilin olarak kabul edildiğinde yalnız amoksisiline duyarlı suş oranı % 28 iken, kombinasyona duyarlı suş oranı % 74 olarak saptanmıştır.

*S.typhimurium* suşlarının da çoğunluğuna klavulanik asit daha etkili bulunmuştur. Klavulanik asit birçok suшта amoksisilin MİK'unu düşürdüğü halde başlangıçtaki yüksek direnç düzeyi ancak bir suşun duyarlı sınırına girmesine neden olmuştur.

Klavulanik asidin daha etkili olduğu suşlar, üç türde de, iki maddenin de çok yüksek konsantrasyonlarında inhibe olan suşlar olmuştur. Klavulanik asidin amoksisilin etkisini artırışı özellikle *P.mirabilis* suşları için önemli düzeyde bulunmuştur.

## SUMMARY

*Comparison of the activities of amoxycillin, clavulanic acid and amoxycillin+clavulanic acid combination to S.aureus, P.mirabilis and S.typhimurium strains.*

The effectivities of amoxycillin, clavulanic acid and amoxycillin+clavulanic acid (2/1) combination (Augmentin) on 101 *S.aureus*, 50 *P.mirabilis* and 30 *S.typhimurium* strains by tube dilution method, and that of amoxycillin and combination on the same strains by disk diffusion method were determined to evaluate the increase in the activity of amoxycillin when combined with clavulanic acid.

Inhibition of 90 % of *S.aureus* strains was achieved by 6.25 µg/ml amoxycillin containing combination while this result was obtained by 25 µg/ml amoxycillin concentration alone. The MIC values of amoxycillin were lowered by clavulanic acid in 75 strains, were not effected in 20 strains, and could not be determined in 6 strains. The increase of amoxycillin activity caused by clavulanic acid was not generally found to be high, shifting only the moderately sensitive strains to full susceptibility in most instances.

Most of the *P.mirabilis* strains were found to be more susceptible to clavulanic acid. If the susceptibility level is accepted as 8 µg/ml for amoxycillin, 28 % amoxycillin sensitivity increased to 74 % for combination.

Most of the *S.typhimurium* strains were also found to be more susceptible to clavulanic acid. Clavulanic acid lowered the MIC values of amoxycillin for most of the strains; but due to the high level of amoxycillin resistance of these strains, this lowering caused the shift from resistance to sensitivity in only one strain.

The strains with a higher sensitivity to clavulanic acid than that to amoxycillin were inhibited only by very high levels of these substances. The increase of amoxycillin activity by clavulanic acid was found to be significant especially in *P.mirabilis* strains.

## GİRİŞ

Bakterilerin duyarlı oldukları kemoterapötiklere direnç kazanmaları çeşitli mekanizmalarla sağlanır. Örneğin kemoterapötüğün hedef aldığı moleküllerde meydana gelen bir yapısal değişiklik kemoterapötüğün bu moleküle afinitesini azaltır ya da yok eder ve molekülün kemoterapötik varlığında da fonksiyon görmesi bakterinin üremesini sağlar. Gram negatif bakterilerdeki porinlerde oluşan değişiklikler gibi hücre duvarının farklılaşması ile kemoterapötüğün bakteriye girmesinin engellenmesi veya bakteriye giren kemoterapötüğün dışarı pompalanmasının kolaylaşması bir diğer direnç mekanizmasını oluşturur. Ya da kemoterapötüğün bloke ettiği bir metabolik olay için bakterinin bir başka metabolik yol kazanması da kemoterapötik varlığında üreyebilmesini sağlar. Bu direnç mekanizmalarından, pratik olarak daha önemli sonuçlar doğuran bir tanesi de bakterinin kemoterapötik maddeyi inaktive eden bir enzim sentezlemesidir (16, 24).

Beta-laktam antibiyotiklere direnç oluşmasında bu son mekanizma, yani bakterinin antibiyotiği inaktive eden bir enzim oluşturması, çok önemli bir rol oynar. Beta-laktam antibiyotikleri inaktive eden bakteri enzimleri asilazlar, esterazlar ve beta-laktamazlar olarak üç grupta toplanabilir. Bunların içinde beta-laktam antibiyotiklere direnç oluşmasında en yaygın rol oynayan ve en büyük pratik önemi olan beta-laktamazlardır (15).

İlk beta-laktamaz 1940 yılında Abraham ve Chain (1) tarafından bir *E.coli* suşunda rastlanmıştır ve o tarihte bilinen tek beta-laktam antibiyotik olan penisilini inaktive ettiği için penisilnaz olarak adlandırılmıştır. Daha sonra 1944'te Kirby (14) penisiline dirençli *S.aureus* suşlarında bu enzimi saptamıştır. Sentetik penisilinlerin elde edilmesi ve sefalosporinlerin bulunmasından sonra bu yeni beta-laktam antibiyotikleri de inaktive eden enzimlerin saptanması nedeniyle bu enzimler beta-laktamaz adıyla anılır olmuştur. Bu enzimlerin çift halkalı moleküler yapısı olan penisilin ve sefalosporinlerdeki beta-laktam halkasını hidrolize etmeleri dolayısıyla de beta-laktamaz olarak adlandırılmaları daha uygundur.

Beta-laktamazlar substrat profiline (hidrolize ettiği antibiyotik tipine), kromozomal veya plasmid genleri tarafından kodlanmalarına, genomunun transpozonda taşınmasına göre çeşitli sınıflandırma ve adlandırılmaları tabi tutulmuştur (20). Enzim genomunun plasmidde (veya transpozonda) taşınması başka bakterilere aktarımını ve dirençli suşların çoğalmasını sağlamak yönünden özel bir öneme sahiptir.

Beta-laktamazlarla oluşan bakteri direncinin üstesinden gelebilmek için bir yandan çeşitli beta-laktamazların etkisine dirençli yeni penisilin ve sefalosporinler sentezleme çalışmaları devam etmekte, bir yandan da kendilerinin antibiyotik etkisi az olduğu halde beta-laktamaz ile birleşerek enzimin antibiyotiği inaktive etmesini engelleyen, bu şekilde bakteri beta-laktamaz oluşturduğu halde etki alınmasını sağlayan maddelerden yararlanılmaktadır (17). Beta-laktamaz inhibitörleri denilen bu maddelerden halen ülkemizde beta-laktam antibiyotiklerle kombine edilerek kullanılan ikisi sulbaktam ve klavulanik asit (potasyum tuzu halinde)'dir. Bu maddelerin her ikisi penisilin nükleusuna çok benzer moleküler yapıya sahiptirler. Ancak bir beta-laktam antibiyotik, örneğin penisilin, beta-laktamaz ile birleşip hidrolize edilince, dolayısıyla inaktive olunca, enzim bir başka molekülü hidrolize etmek için serbest kalır. Böylece reaksiyonun başında aktif bir enzim ve aktif bir antibiyotik molekülüne karşılık, reaksiyon sonunda inaktif bir antibiyotik fakat yine aktif bir enzim molekülü bulunur. Dolayısıyla bakterinin oluşturduğu beta-laktamaz miktarı fazla miktarda antibiyotiği inaktive etmeye yeter. Sulbaktam veya klavulanik asit ise ortamda bulunan beta-laktam antibiyotik ile kompetitif olarak beta-laktamaz molekülünün aktif bölgesi ile birleşir. Bu inhibitörlerin enzime bağlanma afinitesi beta-laktam antibiyotiklerden daha yüksektir. Bu birleşmeden sonra inhibitör molekül parçalanır ve oluşan ileri derecede reaktif kısımlar enzim molekülünün aktif bölgesi dışındaki kısımlarına kovalanarak bağlanır. Bu bağlanma enzimi de irreversibl şekilde etkisiz hale getirir. Dolayısıyla reaksiyon sonunda hem inhibitör molekülün kendisi, hem enzim tahrip edilmiş olur. Bu nedenle de bu inhibitörlere hem düşmanı, hem kendisini tahrip eden intihar komandoları gibi intihar (suicide) inhibitörleri denir (15). Beta-laktamaz inhibitörlerinin hem beta-laktamaz ile bağlanma afinitelerinin beta-laktam antibiyotiklerden daha yüksek olması, hem bağlandıkları enzimi artık antibiyotiği inaktive edemeyecek şekilde tahrip etmeleri, beraber verildikleri antibiyotiğin etki göstermesini sağlar.

Bu çalışmada *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* ve *Salmonella typhimurium* suşlarına amoksisilin ve klavulanik asidin tek başlarına ve amoksisilin+klavulanik asit kombinasyonu (Augmentin) halinde iken etkileri karşılaştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada hepsi muayene maddelerinden rutin yöntemlerle izole ve identifiye edilmiş 101 *S.aureus*, 50 *P.mirabilis* ve 30 *S.typhimurium* suşu kullanılmıştır.

Duyarlık deneyleri hem dilüsyon, hem disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Dilüsyon deneylerinde triptik soy buyyon kullanılmıştır. Aynı sıradaki tüplerde aynı miktar etkili madde bulunmasını sağlamak için dilüsyonlar paralel titrasyon yöntemi ile yapılmıştır. Dilüsyon deneylerinde tablo 1'de gösterilen miktarlar arasında antibiyotik içeren, ikişer kat sulandırım ile hazırlanmış tüp dizileri kullanılmıştır. Kombinasyonda amoksisilin/klavulanik asit oranı 2/1 olmuş ve sonuçlar amoksisilin miktarı üzerinden bildirilmiştir. İnokulum, denenecek bakterinin 24 saatlik buyyon kültürü ml'de  $10^5$  bakteri içerecek şekilde buyyonla sulandırılarak hazırlanmış ve 1 ml antibiyotik içeren tüplere 0.025 ml'lik damla veren Pasteur pipeti ile bir damla olarak ilave edilmiştir. İnokulumun tüplerdeki antibiyotik konsantrasyonunu sulandırma etkisini gidermek için antibiyotik miktarları gerekenden % 2.5 fazla tartılmıştır. İnokulum ilave edilmiş dilüsyon tüpleri 37°C'de 16-18 saat bekletildikten sonra sonuçlar okunmuş ve hiçbir üreme görülmeyen en az antibiyotik içeren tüpteki antibiyotik konsantrasyonu minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak kabul edilmiştir.

Tablo 1. Dilüsyon deneylerinde kullanılan antibiyotik sınırları ( $\mu\text{g/ml}$ ).

	S.aureus için	P.mirabilis ve S.typhimurium için
Klavulanik asit	1.56 - 100	7.81 - 250
Amoksisilin	0.195 - 100	0.97 - 500
Kombinasyonda amoksisilin*	0.097 - 12.5	0.06 - 31.25

\* gösterilen amoksisilin miktarının yarısı kadar da klavulanik asit içermektedir.

Disk difüzyon yönteminde infüzyon buyyonu ile hazırlanmış jeloz besiyeri ve ml'de  $10^5$  bakteri içeren inokulum kullanılmıştır. Disklerin içerdiği antibiyotik miktarları ve değerlendirme kriterleri tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Disk difüzyon deneylerinde disk içeriği ve değerlendirme.

Disk içeriği:			
Amoksisilin:	25 µg		
Kombinasyon:	20 µg amoksisilin+10 µg klavulanik asit		
Değerlendirme:		İnhibisyon zonu çapı (mm)	
		Duyarlı	Orta duyarlı .Dirençli
Amoksisilin:	≥ 21	14 - 20	≤13
Kombinasyon			
S.aureus:	≥ 20		≤19
Diğerleri:	≥ 18	14 - 17	≤13

*S.aureus* suşlarında çabuk iyodometrik yöntemle beta-laktamaz oluşturma aranmıştır (23). Fosfat tamponlu suda 6 µg/ml penisilin G çözeltisinden 0.1 ml içinde koyu süspansiyon haline getirilip oda sıcaklığında bekletilen bakteri üzerine nişasta ve iyot çözeltileri damlatıldıktan sonra meydana gelen mavi rengin ençok10 dakika içinde beyazlaşması beta-laktamaz oluşturma işareti olarak alınmıştır.

Amaç klavulanik asit veya amoksisilinin *S.aureus* suşlarına ne oranda etkili olduğunu değil, klavulanik asidin amoksisilini ne oranda kuvvetlendirdiğini (potansiyelize ettiğini) göstermek olduğundan tablolar kümülatif olarak düzenlenmemiştir.

## BULGULAR

Klavulanik asit, amoksisilin ve kombinasyonlarının *S.aureus* suşları için MİK değerleri tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. 101 *S.aureus* suşu için MİK'lar (µg/ml).

	0.097	0.195	0.39	0.78	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	100	100<
Klavulanik asit					1	2		17	54	6	11	10
Amoksisilin		14*	6	31	11	1	6	12	14	4	2	
Kombinasyon***	5*	14	28	23	6	4	12	8	1**			

\*: veya daha az, \*\*: veya daha fazla, \*\*\*: gösterilen miktar amoksisilin+yansı kadar klavulanik asit

Suşların 91'inde amoksisilinin MİK'u klavulanik asidinkinden daha düşük bulunmuş, amoksisilinin 12.5 µg/ml konsantrasyonunda inhibe olmayan 10 suştan 5'inde klavulanik asit daha etkili, 5'inde ise iki maddenin MİK'larının eşit olduğu

saptanmıştır. Klavulanik asit amoksisilin ile kombine edildiğinde bir kısım *S.aureus* suşunun daha düşük amoksisilin konsantrasyonunda inhibe olmasını sağlamıştır. Yarıya kadar klavulanik asit içeren kombinasyonda *S.aureus* suşlarına amoksisilin MİK değerlerinde saptanan düşmeler tablo 4'de gösterilmiştir. Tabloda gösterildiği gibi 101 suştan 6'sında suşların MİK'ları çalışma konsantrasyonlarının dışında kaldığından klavulanik asidin amoksisilini potansiyelize edip etmediği anlaşılamamış, sonuç alınan 95 suştan 20'sinde yarıya kadar klavulanik asit bulunduğu amoksisilin MİK'u değişmemiştir. Buna karşılık 75 suşta yarıya kadar klavulanik asit varlığında amoksisilin MİK'unda düşme gözlenmiş, 46 suş için amoksisilin MİK'u 1/2'ye, 16 suş için 1/4'e, 5 suş için 1/8'e, 3 suş için 1/16'ya, 5 suş için 1/32'ye düşmüştür.

Tablo 4. *S.aureus* suşları için kombinasyonda amoksisilin MİK'nunda azalma.

	Yok	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	?
Suş sayısı	20	46	16	5	3	5	6

Disk difüzyon deneyi ile *S.aureus* suşlarının amoksisiline ve kombinasyona duyarlık sonuçları tablo 5'de, kombinasyonda amoksisilin MİK'unun azalmasına göre difüzyon sonuçlarındaki değişimler tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 5. *S.aureus* suşlarında disk deneyi sonuçları.

	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Amoksisilin	36	41	24
Kombinasyon	81		20

Tablo 6. *S.aureus* suşlarında MİK azalmasına göre disk difüzyon deneyi sonuçları.

MİK azalması	Suş sayısı		Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli	Ortalama zon çapı (mm)
Yok veya ?	26	Amoksisilin	20	4	2	23
		Kombinasyon	24		2	27
1/2	46	Amoksisilin	16	19	11	17
		Kombinasyon	37		9	24
1/4	16	Amoksisilin	0	8	8	13
		Kombinasyon	9		7	20
1/8	5	Amoksisilin	0	3	2	13
		Kombinasyon	4		1	23
1/16	3	Amoksisilin	0	2	1	14
		Kombinasyon	2		1	22
1/32	5	Amoksisilin	0	5	0	15
		Kombinasyon	5		0	25

Tabloların izlenmesi amoksisiline dirençli 4 suşun ve orta duyarlı 41 suşun kombinasyona duyarlı bulunduğunu göstermektedir.

*S.aureus* suşlarının 92'sinin beta-laktamaz oluşturduğu, 9'unun ise oluşturmadığı saptanmıştır. Beta-laktamaz oluşturmayan 9 suştan yalnız birinde klavulanik asit amoksisilin MİK'unu 1/2'ye düşürmüş, sekizinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır.

*P.mirabilis* ve *S.typhimurium* suşlarına klavulanik asit amoksisilinden daha etkili bulunmuştur. *P.mirabilis* suşlarıyla dilüsyon deneylerinde alınan sonuçlar tablo 7'de gösterilmiştir. Suşların 30'u için klavulanik asidin, 16'sı için amoksisilinin MİK'u daha düşük, 4'ü için iki maddenin MİK'u eşit bulunmuştur.

Tablo 7. 50 *P.mirabilis* suşu için MİK'lar ( $\mu\text{g/ml}$ ).

	0.12	0.24	0.48	0.97	1.95	3.90	7.81	15.62	31.25	62.5	125	250	500	500<
Klavulanik asit										9	28	13		
Amoksisilin				10	4			1	1	1	5	1	4	23
Kombinasyon* 3				9	7	7	11	7	6					

\* : gösterilen miktar amoksisilin+yarısı kadar klavulanik asit.

MİK'un eşit veya klavulanik asit için daha düşük olduğu suşlar iki maddenin ancak 62.5  $\mu\text{g/ml}$  veya daha yüksek konsantrasyonlarında inhibe edilmişlerdir. Suşların çoğuna klavulanik asit daha etkili bulunduğu için değerlendirme iki yönde yapılmış ve bu suşlarda klavulanik asidin potansiyelize olduğu varsayılarak değerlendirmede klavulanik asit miktarı dikkate alınıp amoksisilin yok sayılmıştır. Buna göre 30 suş için kendisinin iki katı miktarda amoksisilin bulunduğunda klavulanik asidin MİK'undaki azalma ve 20 suş için kendisinin yarısı kadar klavulanik asit bulunduğu amoksisilinin MİK'undaki azalma tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. *P.mirabilis* suşları için kombinasyonda MİK azalmaları.

	0	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Klavulanik asidin daha etkili olduğu 30 suşa			5	12	5	5	3
Amoksisilinin daha etkili olduğu 16 suşa	10	1		3	1	1	
İkisinin eşit etkili olduğu 4 suşa					1	2	1

Disk difüzyon deneyi ile *P.mirabilis* suşlarının amoksisiline ve kombinasyona duyarlık sonuçları tablo 9'da gösterilmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle amoksisiline dirençli bulunan 34 suştan biri kombinasyona da dirençli, sekizi orta duyarlı, 25'i duyarlı; amoksisiline orta duyarlı bulunan bir suş kombinasyona duyarlı; amoksisiline duyarlı bulunan suşlar kombinasyona da duyarlı bulunmuştur.

Tablo 9. *P.mirabilis* suşlarında disk deneyi sonuçları.

	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Amoksisilin	15	1	34
Kombinasyon	41	8	1

*S.typhimurium* suşlarıyla dilüsyon deneylerinde alınan sonuçlar tablo 10'da gösterilmiştir. Suşların 25'ine klavulanik asit, 3'üne amoksisilin daha etkili

Tablo 10. 30 *S.typhimurium* suşu için MİK'lar (µg/ml).

	0.48	0.97	1.95	3.90	7.81	15.62	31.25	62.5	125	250	500	500<
Klavulanik asit								2	20	6		2**
Amoksisilin			2	1								27
Kombinasyon*	2			1	1	2	22	2**				

\* : gösterilen miktar amoksisilin+ yarısı kadar klavulanik asit, \*\* : veya daha fazla

bulunmuş, 2 suş klavulanik asidin kullanılan konsantrasyonları dışında dirençli olduğu için değerlendirilememiştir. Amoksisiline daha duyarlı bulunan 3 suş dışındakiler çok yüksek konsantrasyonlarda amoksisilin veya klavulanik asit varlığında da üremişlerdir. Klavulanik asidin daha etkili olduğu 25 suşta amoksisilinle kombinasyon halinde iken klavulanik asidin MİK değerinde azalma oranları tablo 11'de gösterilmiştir. Amoksisilin daha etkili olduğu 3 suştan birinde klavulanik asitle kombinasyon amoksisilin MİK'unu değiştirmemiş, 2 suşta 1/2'ye düşürmüştür.

Tablo 11. Klavulanik asidin daha etkili olduğu 25 *S.typhimurium* suşunda kombinasyon halinde klavulanik asidin MİK'unda azalma.

	≤ 1/2	1/4	1/8	1/32
Suş sayısı	2	15	7	1



Disk difüzyon deneyi ile *S.typhimurium* suşlarının amoksisiline ve kombinasyona duyarlık sonuçları tablo 12'de gösterilmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle amoksisiline dirençli bulunan 27 suşun kombinasyona 12'si dirençli, 13'ü orta duyarlı, 2'si duyarlı; amoksisiline orta duyarlı bulunan 1 suş ile duyarlı bulunan 2 suş kombinasyona duyarlı bulunmuştur.

Tablo 12. *S.typhimurium* suşlarında disk deneyi sonuçları.

	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Amoksisilin	2	1	27
Kombinasyon	5	13	12

## TARTIŞMA

Ülkemizde muayene maddelerinden izole edilen suşların kemoterapötiklere direnci genelde batı ülkelerindeki direnç düzeyinin çok üstünde bulunmaktadır. Nitekim amoksisilin ve *S.aureus* ile aldığımız sonuçlar da bunu göstermiş, suşların % 90'ı ancak 25 µg/ml konsantrasyonda inhibe edilmiş (Tablo 3), disk difüzyon deneylerinde suşların yaklaşık 1/4'ü dirençli, kalanların da büyük kısmı ancak orta duyarlı bulunmuştur (Tablo 5). Klavulanik asidin tek başına bu suşlara etkisi daha azdır ve 12.5 µg/ml'den düşük konsantrasyonda yalnız 3 suş etkilenmiştir.

*S.aureus* suşlarının % 90'ını ancak 25 µg/ml konsantrasyonda inhibe eden amoksisilin, yarısı kadar klavulanik asit içeren kombinasyonda 6.25 µg/ml konsantrasyonda bu etkiyi sağlamıştır. Buna benzer sonuçlar bildiren çalışmalar varsa da (12), birçok çalışmada klavulanik asitle kombine edildiğinde *S.aureus* suşlarını inhibe etmek için 2 µg/ml (21, 26) ya da 1 µg/ml (11) amoksisilin konsantrasyonu yeterli bulunmuştur. Çalışmamızda daha yüksek değerler bulmamız ülkemizdeki suşların daha dirençli olduğunun bir başka göstergesidir. Klavulanik asit çalışmamızda da amoksisilin'in etkisini artırmış ve değerlendirilebilen 95 suştan 75'inde amoksisilin'in MİK'ünü düşürmüştür. Ancak bu MİK azalması suşların pek büyük kısmında 1/2 - 1/4 oranlarında olmuş (Tablo 4) ve bu oranda MİK düşüşü çok dirençli olan suşların duyarlı sınırına çekilmesine yetmemiştir. Nitekim disk difüzyon deneylerinde de amoksisiline 24 olan dirençli suş sayısı kombinasyon için 20 olarak bulunmuştur. Amoksisilin+klavulanik asit kombinasyonunda duyarlık sınırı  $\leq 2/1$  µg/ml olarak kabul edilirse (5), kombinasyona *S.aureus* suşlarımızın 76'sı duyarlı, 25'i dirençlidir. Ancak suşların 62'sinin 1.56 µg/ml amoksisilinde de inhibe edildiği düşünülürse klavulanik asidin etkinliği çok fazla artırdığı söylenemez. Kombinasyona duyarlık sınırının  $\leq 4$  µg/ml olarak kabul edilmesi sonuçlarımızı çok etkilememektedir. Difüzyon ve difüzyon deneyleri birlikte değerlendirildiğinde klavulanik asidin İstanbul'da izole edilen *S.aureus* suşlarına amoksisilin'in etkisini daha çok orta duyarlı suşların duyarlı sınırına çekilmesi şeklinde etkilediği görülmektedir.

Amoksisilin ve klavulanik asit kombinasyonu ile ülkemizde birçok in vitro duyarlık çalışması yapılmıştır. Ayaşlıoğlu ve arkadaşları (4) 8 µg/ml'i duyarlık sınırı olarak kabul ettikleri ve dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında *S.aureus* suşlarının % 75'ini, koagulaz negatif stafilkokların ise % 56.5'ini amoksisilin+klavulanik asit kombinasyonuna duyarlı bulmuşlardır. Böyle yüksek bir konsantrasyon duyarlık sınırı olarak kabul edilirse bizim çalışmamızda 6.25 µg/ml amoksisilin içeren kombinasyonda *S.aureus* suşlarımızın % 91'i inhibe olmuştur. Disk difüzyon yöntemi ile yapılan çeşitli çalışmalardan birinde Töreci ve arkadaşları (25) *S.aureus* suşlarının % 74.7'sini amoksisilin+klavulanik asit kombinasyonuna duyarlı bulmuşlar, bu oran metisiline dirençli suşlarda % 41.1'e düşmüştür. Gürlü ve arkadaşları (13) *S.aureus* suşlarında amoksisiline duyarlı oranını % 19, kombinasyona duyarlı oranını % 75 olarak saptarken, Rota ve Bilgin (19) bu oranları sırayla % 61 ve % 91 olarak saptamışlardır. Ampisilin kullanıldığı fakat amoksisilin ayrıca kullanılmadığı iki çalışmadan birinde Çetin ve arkadaşları (8) ampisiline % 1'i duyarlı olan 100 *S.aureus* suşunun % 96'sını, Willke ve arkadaşları (28) ise ampisiline % 5'i duyarlı olan *S.aureus* suşlarının % 98'ini amoksisilin+klavulanik asit kombinasyonuna duyarlı bulmuşlardır. Görüldüğü gibi çeşitli çalışmalarda gerek amoksisilin, gerek amoksisilin+klavulanik asit kombinasyonuna duyarlı suş oranları geniş sınırlar içinde değişmekte, bu çalışmadaki disk yöntemi sonuçlarımız diğer çalışmaların ortalamasına oldukça yakın görülmektedir.

Ülkemizde bakterilerin yüksek direnç düzeyi nedeniyle, Gram negatif çomaklarla olan infeksiyonların tedavisinde amoksisilin kullanılması nadiren düşünülür. Ancak direnç düzeyinin düşük olduğu ülkelerde amoksisilin *P.mirabilis* ve *Salmonella* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler arasındadır. Bu nedenle amoksisilin klavulanik asitle kombine edildiğinde bu suşların amoksisilin duyarlılığının tedavide kullanılabilir düzeyde düşüp düşmediğini araştırmak için *P.mirabilis* ve *S.typhimurium* suşları çalışmamıza katılmıştır. Bu suşlarla yapılan deneylerde ilk dikkati çeken bulgu suşların büyük çoğunluğu için amoksisilin MİK değerlerinin klavulanik asidin MİK değerlerinden daha yüksek olduğudur. Kısaca bu tür suşlarımızın çoğunluğu klavulanik aside daha duyarlı bulunmuştur. Ancak her iki maddenin etkili olabildiği konsantrasyonlar genelde tedavide erişilebilecek düzeylerin çok üstünde olmuştur.

Klavulanik asidin 100 µg/ml konsantrasyonu *P.mirabilis* suşlarının tamamını inhibe ettiği halde, bu konsantrasyonda amoksisilin suşların sadece % 34'ünü inhibe etmiş, suşların yarıya yakını 500 µg/ml amoksisilin konsantrasyonunda bile inhibe olmamıştır (Tablo 7). Benzer bulgular başka araştırmacılarca da bildirilmiştir (18). Buna karşılık 31.25 µg/ml amoksisilin ve yarısı kadar klavulanik asit içeren kombinasyon *P.mirabilis* suşlarımızın tamamını inhibe etmiştir. *P.mirabilis* suşlarının 1-2 µg/ml (9) veya 25 µg/ml (6) amoksisilin içeren kombinasyonda inhibe edildiğini bildiren çalışmalar da vardır. Bir çalışmada da 32 µg/ml amoksisilin içeren kombinasyonun

suşların ancak % 76'sını inhibe ettiği bildirilmiştir (27). Gram negatif çomaklar için amoksisilin+klavulanik aside duyarlık sınırı  $\leq 8/4 \mu\text{g/ml}$  olarak kabul edilince (5) *P.mirabilis* suşlarımızın % 74'ü kombinasyona duyarlı kabul edilebilir (Tablo 7). Klavulanik asidin daha etkili olduğu suşlarda kombinasyonda MİK azalması daha bariz olduğundan (Tablo 8) bu durumda adeta amoksisilin klavulanik asidi potensiyelize ediyor görülmektedir. Disk difüzyon deneyleri de *P.mirabilis* suşları için kombinasyonun amoksisilinden çok daha etkili olduğunu göstermiştir. Amoksiline 34 olan dirençli suş sayısı kombinasyon için 1 olarak bulunmuştur (Tablo 9).

Ülkemizde *Proteus* suşlarına amoksisilin+klavulanik asit kombinasyonunun denendiği diğer çalışmalardan birinde Rota ve Bilgin (19) tür belirtmedikleri *Proteus* suşlarının % 14'ünü amoksisiline, % 76'sını kombinasyona; bir diğerinde Willke ve arkadaşları (28) % 12'sini amoksisiline, % 72'sini kombinasyona; bir diğerinde Emre ve arkadaşları (10) 17 *Proteus* suşunun 2'sini amoksisiline, 9'unu kombinasyona duyarlı olarak bildirmişlerdir. Çetin ve arkadaşları (8) % 15'i ampisiline duyarlı olan *P.mirabilis* suşlarının % 47'sini kombinasyona duyarlı bulmuşlardır. Çalışmamızda disk difüzyon yöntemi ile alınan sonuçlar suşlarımızın biraz daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

*S.typhimurium* suşları ile aldığımız sonuçlar da, klavulanik asidin daha etkili bulunması yönünden, *P.mirabilis* suşları ile alınan sonuçlara benzemektedir. Ne var ki, 30 suşun 27'si yalnız amoksisilin ile  $500 \mu\text{g/ml}$ 'de bile inhibe olmazken, kombinasyonda MİK değerleri  $15-30 \mu\text{g/ml}$  amoksisilin düzeyine düşmüş fakat duyarlık sınırının altına inmemiştir. Duyarlık sınırı *P.mirabilis*'teki gibi kabul edilirse amoksisiline 3 olan duyarlı suş sayısı kombinasyon için yalnızca 4 olmuştur (Tablo 10). Buna paralel olarak disk difüzyon deneyinde de amoksisiline dirençli suşların yarıya yakını kombinasyona da dirençli bulunurken hemen yarısı da sadece orta duyarlı işareti olan inhibisyon zonları vermiştir (Tablo 12). Çetin ve arkadaşları (8) ampisiline % 2'si duyarlı olan *S.typhimurium* suşlarının % 34'ünü, Willke ve arkadaşları (28) ise ampisiline % 31'i duyarlı olan *Salmonella* suşlarının % 84'ünü amoksisilin+klavulanik asit kombinasyonuna duyarlı bulmuşlardır.

Amoksisilin+klavulanik asit kombinasyonu ile ülkemizde çeşitli tedavi çalışmaları da yapılmıştır. Örneğin Alkibay ve arkadaşları (2) üriner infeksiyonlu 38 hastanın %68'inde bu kombinasyonla bakteriyolojik iyileşme sağlamışlardır. Tellaloğlu ve arkadaşları (22) hepsi amoksisilin+klavulanik asit kombinasyonuna duyarlı suşlarla oluşan 35 idrar yolu infeksiyonu olgusunu kombinasyon ile tedavi etmişler, izleyebildikleri 28 olgunun 20'sinde başarılı sonuç almışlardır. Altı olguda tedavi sırasında ilk etken kaybolduğu halde başka bakterilerle reinfeksiyon oluşmuş, bir olguda aynı etkenle relaps, bir olguda da reinfeksiyon+relaps saptanmıştır. Anarat ve arkadaşları (3) 23'ünde etkenin Gram negatif bakteriler olduğu 26 idrar yolu infeksiyonunda amoksisilin+klavulanik asit kombinasyonu ile tedaviyi denemişler, etkenin duyarlı bulunduğu 12 olgunun tamamında, dirençli bulunduğu 14 olgunun da 8'inde (bütün olguların % 77'sinde) başarılı sonuç almışlardır. Emre ve arkadaşları (10) ise bu

kombinasyonu idrar yolu infeksiyonlu 15 çocukta denemişler, hızla elimine edilen bakteriyünün tedavisi kesildikten sonra 4 olguda tekrarladığını saptamışlardır. Çavdar ve arkadaşları (7) ise 22 akciğer infeksiyonlu hastanın 18'inde amoksisilin+klavulanik asidi çok etkili veya etkili bulmuşlardır.

Çalışmamızda *S.aureus*, *P.mirabilis* ve *S.typhimurium* türleri ile alınan sonuçlar klavulanik asitle kombine edildiğinde amoksisilin'in etkinliğinin genelde arttığını fakat bir kısım suşların, doğal olarak, kombinasyona da dirençli olduğunu, etkinlik artışının *P.mirabilis* suşlarında diğer iki türe göre daha önemli olduğunu göstermiştir.

#### KAYNAKLAR

1. Abraham E P, Chain E: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin, *Nature* 146: 837 (1940).
2. Alkibay T, Bozkırlı İ, Tokuçoğlu H, Kuştimur S, Demirel F, Deniz N: Üriner infeksiyonlarda amoksisilin-potasyum klavulanat ve sulbaktam-ampisilin'in etkinliği (özet), *ANKEM Derg* 2: 136 (1988).
3. Anarat A, Aksaray N, Altıntaş G, Satar M: Çocukluk çağındaki üriner sistem infeksiyonlarında amoksisilin+klavulanik asit tedavisi, *ANKEM Derg* 1: 413 (1987).
4. Ayaşlıoğlu E, Arman D, Balık İ, Altay G: Koagülaz negatif ve pozitif stafilokokların ampisilin, penisilin, ampisilin+sulbaktam ve amoksisilin+klavulanat'a duyarlılıkları (özet), *ANKEM Derg* 2: 111 (1988).
5. Beecham Research Laboratories: Augmentin. Sensitivity testing and assay methodology, Beecham Research Laboratories, Brentford (1986).
6. Comber K R, Horton R, Layte S J, Wite A R, Sutherland R: Augmentin; Antibacterial activity in vitro and in vivo, " G N Rolinson, A Watson (eds): *Augmentin. Clavulanate - potentiated Amoxycillin*" kitabında s. 19, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton (1980).
7. Çavdar T, Erkan F, Şahin Z, Tetikkurt C, Gazioğlu K: Kronik obstrüktif akciğer hastalarında amoxicillin+clavulanic asit ile aldığımız sonuçlar (özet), *ANKEM Derg* 1: 136 (1987).
8. Çetin E T, Töreci K, Badur S, Erdeniz H: Muayene maddelerinden izole edilen bakterilerin bazı aminoglikozid, sefalosporin, penisilin grubu antibiyotiklere, beta-laktamaz inhibitörleri ile birlikte kullanılan penisilinlere ve ofloksasine duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 1: 423 (1987).
9. Drug Information 87: Amoxicillin and clavulanate potassium, s.250, American Society of Hospital Pharmacists, Inc (1987).
10. Emre S, Tanman F, Şirin A, Kebudi R, Kaygusuz A, Anđ Ö: Çocuklarda idrar yolu infeksiyonlarının tedavisinde amoksisilin+klavulanat kombinasyonu ile bir klinik çalışma, *ANKEM Derg* 1: 418 (1987).
11. Farrell I D, Brookes G R: The laboratory efficacy of amoxycillin and clavulanic acid combinations, "G N Rolinson, A Watson (eds): *Augmentin. Clavulanate-potentiated Amoxycillin*" kitabında s.54, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton (1980).
12. Fuchs P C, Barry A L, Thornsberry C, Gavan T L, Jones R N: In vitro evaluation of Augmentin by broth microdilution and disk diffusion susceptibility testing; Regression analysis, tentative interpretive criteria, and quality control limits, *Antimicrob Agents Chemother* 24: 31 (1983).

13. Gürler N, Sarpel C, Töreci K, Çetin E T: Muayene maddelerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının kemoterapötik maddelere duyarlılığı, *KÜKEM Derg* 12: 9 (1989).
14. Kirby W M M: Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin-resistant staphylococci, *Science* 99: 452 (1944).
15. Laden S K, Hamilton C W, Romankiewicz J A, Acar J F: Overview of antimicrobial agent resistance, "J F Acar (ed): *Beta-lactamase Inhibition: Pharmacology, Antimicrobial Activity, and Pharmacokinetics*" kitabında s. 7, Advanced Therapeutics Communications Inc, New Jersey (1985).
16. Lewis M J: Resistance to antimicrobial agents, "D Greenwood (ed): *Antimicrobial Chemotherapy*" kitabında s.109, Bailliére Tindall, London (1983).
17. Neu H C: Beta-lactamase inhibition: therapeutic advances. Contribution of beta-lactamases to bacterial resistance and mechanisms to inhibit beta-lactamases, *Amer J Med* 79 (Suppl 5B): 1 (1985).
18. Peters G, Pulverer G, Neugebauer M: In vitro-activity of clavulanic acid and amoxicillin combined against amoxicillin-resistant bacteria, *Infection* 3: 8 (1980).
19. Rota S, Bilgin M: Klavulanik asit/amoksisilin kombinasyonunun antibakteriyel etkisinin araştırılması, *İnfeksiyon Derg* 2: 375 (1988).
20. Slocombe B: Beta-lactamases: Occurrence and classification, "G N Rolinson, A Watson (eds): *Augmentin. Clavulanate-potentiated Amoxycillin*" kitabında s.8, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton (1980).
21. Slocombe B, Beale A S, Boon R J, Griffin K E, Masters P J, Sutherland R, White A R: Antibacterial activity in vitro and in vivo of amoxycillin in the presence of clavulanic acid, *Postgrad Med Sep/Oct*: 29 (1984).
22. Tellaloğlu S, Töreci K, Akıncı M, Derbentli Ş, Çetin E T, Karaman M İ, Katrancı H, Özcan F: Üriner infeksiyonların amoksisilin/klavulanat kombinasyonu ile tedavisi, *ANKEM Derg* 2: No.3-4 (1988) (baskıda).
23. Thornsberry C: Rapid laboratory tests for beta-lactamase production by bacteria, s.27, *Center for Disease Control*, Atlanta (1977).
24. Töreci K: Kemoterapötiklere direnç mekanizmaları, *KÜKEM Derg* 9: 41 (1986).
25. Töreci K, Gürler N, Çalangu S, Sarpel C, Eraksoy H, Özsüt H, Çetin E T: Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated in Istanbul, *ANKEM Derg* 2: No.3-4 (1988) (baskıda).
26. Van Landuyt H W, Lambert A: Microbiological testing of the action of Augmentin, "Augmentin: A Review of the literature from 1980-1984" kitabında s.7, Excerpta Medica, Amsterdam (1985).
27. Verbist L: Antimicrobial activity of Augmentin in vitro "E A P Croydon, M F Michel (eds): *Augmentin, Clavulanate-potentiated Amoxycillin*. Proceedings of the European Symposium. Scheveningen, The Netherlands 28-29 June, 1982" kitabında s.42, Excerpta Medica, Amsterdam (1983).
28. Willke A, Tural D, Gültan K, Tekeli E: Ampisilin ve beta-laktamaz inhibitörlü kombine preparatların bazı bakterilere karşılaştırılmalı etkinlikleri (özet), *ANKEM Derg* 2: 127 (1988).