

POSTANTİBİYOTİK ETKİ VE BAKTERİLERDE ANTİBİYOTİKLERE KARŞI TOLERANS

Kurtuluş TÖRECI

Postantibiotic effect and antibiotic tolerance in bacteria.

Çok defa infeksiyon etkeninin duyarlı veya dirençli olması basitliğine indirgediğimiz antibiyoterapide, aslında, antibiyotik ile etken mikroorganizma arasındaki ilişkileri etkileyen çok sayıda faktör vardır. Burada bu faktörlerden sadece ikisi, postantibiyotik etki ve bakterilerde antibiyotik toleransı üzerinde durulacaktır.

POSTANTİBİYOTİK ETKİ

Postantibiyotik etki (PAE), bir antibiyotiğin üremeyi durduran konsantrasyonlarına maruz bırakılan bir bakterinin, antibiyotik ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hemen antibiyotiğe maruz kalmamış bakteri gibi üremeye başlayamamasına yol açan kalıcı antibiyotik etkisidir. Birçok antibiyotik-bakteri karşılaşmalarında antibiyotik ortamdan yok edilse de inhibisyon etkisi bir süre daha devam eder. Antibiyotiğe maruz kalan bakterinin üremesinin antibiyotikle temas etmemiş bakterinin üreme hızına erişmesi için bir süre geçmesi gerekir. PAE bu süre ile ölçülen bir etkidir. Bu nedenle literatürde "kalıcı baskılayıcı etki", "kalıcı antibiyotik etkisi", "post-MIC etki", "neka-hat periyodu" gibi çeşitli deyimler de önerilmiş ancak yaygın olarak kullanılan deyim PAE olmuştur.

PAE ilk defa 1944'de penisilinle temas etmiş bir stafilokok kültürünün penisilinaz ile antibiyotiğin tahrip edilmesinden ancak 1-3 saat sonra normal üremesine başlayabilmesinin gözlenmesi ile farkedilmiştir(2). Önceleri daha çok beta-laktam antibiyotikler ve Gram pozitif koklar arasında bir etkileşim gibi ele alınan PAE'nin yeni antibiyotikler ve Gram negatif bakteriler arasında da gözlenmesi, oluşturulan hayvan deneyi modellerinde in-vivo olarak da saptanması antibiyoterapide doz aralığının belirlenmesinde dikkate alınması gerekeceğini düşündürmüştü ve 1980'lere doğru çok sayıda çalışmada konu edilmesine yol açmıştır. Halen de antibiyotiklerle ilgili periyodiklerde en sık rastlanan çalışma konularından birini oluşturmaktadır.

Bir antibiyotiğin bir bakteriyeye in-vitro PAE'sini saptamak için en çok kullanılan yöntem logaritmik üreme fazındaki bakteri kültürünün MIC'un 1-10 katı antibiyotikle 1-3 saat temasta bırakılması, antibiyotiğin uzaklaştırılması, antibiyotiğin uzaklaştırıldığı andaki canlı bakteri sayısının 10 katına çıkması ($1 \log_{10}$ artması) için gereken sürenin saptanması (T) ve bu süreden antibiyotikle temas etmemiş kontrol kültüründeki bakteri sayısının 10 kat artması için gereken sürenin (C) çıkarılmasıdır(5). Bu nedenle in-vitro PAE

$$PAE = T - C$$

formülü ile belirlenir. Bu belirlemede bakterinin ürettiği uygun besiyeri ve kültür koşullarını sağlamak, 10^6 - 10^7 cfu/ml içeren logaritmik fazda kontrol ve deney kültürlerini hazırlamak, bunlarda canlı bakteri sayımını yapmak ve deney kültürüne istenilen konsantrasyonda antibiyotik ilave edip istenilen süre bekletmek deneyin ilk adımıdır. Deney kültürüne antibiyotiğin ilave edildiği zaman $t=0$ kabul edilir. İstenilen temas süresi geçtiğinde deney tüpündeki antibiyotiğin uzaklaştırılması için çok defa; (a)ya birkaç defa bakterilerin santrifüjle çöktürülerek antibiyotiksiz besiyerinde tekrar süspansedilmesi, veya (b) kültürün yüz ya da bin defa sulandırılarak antibiyotiğin de bu oranda dilüe edilmesi tercih edilir. Kontrol kültürüne de aynı işlemler uygulanır. Bu işlem sonunda canlı bakteri sayımı yapılır ve belirli aralarla canlı bakteri sayımı yapılarak işlem sonundaki sayının 10 kat artması için geçen süre saptanır. Kontrol ve deney kültürleri için gereken zaman farkı o antibiyotiğin kullanılan MIC katı konsantrasyonda kullanılan temas süresinde o bakteride oluşturduğu PAE'i verir.

Aslında antibiyotikle temas etmiş kültürdeki bakterilerin hepsi PAE süresi kadar bir zaman baskılanıp sonra normal kültürdeki gibi üremeye başlamazlar. Bazıları daha erken, bazıları daha geç bölünmeye başlar ve giderek normal jenerasyon süresini tekrar kazanırlar. **Yapılan deneyler**

Istanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Çapa, İstanbul.

bakteri sayısı 10 kat arttığında kontrol kültüründeki türeme hızının elde edildiğini gösterdiğinden PAE'yi ölçmek için kontrol ve deney kültürlerinde bakteri sayısının 10 kat artması için geçen sürelerin farkı kullanılır(55).

In-vitro PAE belirlenmesinde antibiyotiği uzaklaştırmak için enzim inaktivasyonu, kontrol ve deney kültürlerindeki bakteri miktarını ölçmek için canlı bakteri sayımından başka optik dansite(47), bakteri içinde ATP düzeyi ölçümü(32), Bactec NR 730 kan kültürü cihazında otomatik GV (growth value) değeri ölçümü(14), filaman oluşturan bakteri oranı(31) gibi başka yöntemler de önerilmiştir. Bu yöntemlerin tartışması bir başka yazımızda verilmiştir(51). Antibiyotiklerin kalıcı etkisini belirlemek için PAE yerine "mean recovery time" olarak tarif ettikleri başka ölçütler ileri sürülen de vardır(34).

In-vitro PAE ölçümlerinde alınan sonuçlarda bazı faktörlerin etkisi görülür. En önemli iki faktör bakterinin maruz kaldığı antibiyotik konsantrasyonu ve temas süresidir. Konsantrasyon genellikle MIC'in katı olarak ifade edilir ve bir bakteri kendisine PAE gösteren bir antibiyotiğin bir sınıra kadar daha yüksek konsantrasyonlarına maruz kaldığında daha uzun PAE süresi saptanır. Örneğin beta-laktam antibiyotiklerin *S.aureus*'a PAE'si antibiyotik konsantrasyonu 6-10 MIC'e kadar artırılınca giderek uzar ve en yüksek değere varır. Daha yüksek antibiyotik konsantrasyonu kullanıldığında da bu değer aşılmaz(5). Sadece rifampisin bu kurala aykırı davranır ve konsantrasyon arttıkça daha uzun PAE süreleri elde edilir(5,55). Bakteri belli bir antibiyotik konsantrasyonuna değişik süreler maruz bırakıldığında da benzer bir sonuç alınır ve süre 4-8 saate kadar uzatıldıkça daha yüksek PAE değerleri elde edilir; fakat PAE belli bir temas süresinde maksimal değere erişir, süre daha uzatılınca bu değer artmaz. Özellikle kinolonların yüksek konsantrasyonlarda (10 x MIC) 5 dakika gibi kısa süre temasının bakteride optimal PAE oluşturabildiği bildirilmiştir(41).

PAE in-vivo olarak da görülür. Esasen konuya pratik bir önem kazandıran yönü in-vivo da görülmesi ve bu şekilde daha aralıklı doz uygulamalarını mümkün kılmasıdır. Bir antibiyotiğin bir bakteriye in-vivo PAE'sini ölçmek için en çok kullanılan yöntem siklofosamid ile nötrojenik hale getirilmiş farelerin kullanıldığı fare budu yöntemidir(5). Bunun için çok sayıda farenin buduna bakteri injekte edilir. Birkaç saat sonra serumda ya da enfeksiyon yerinde 1-2 MIC elde edilecek miktarda tek doz antibiyotik injekte edilir. Belirli aralarla birkaç fare öldürülür, budları homojenize edilir ve canlı bakteri sayımı yapılır. Bu arada öldürülen farelerde hiç değilse MIC altına düşene kadar serumda veya homojenizatta antibiyotik konsantrasyonu da saptanmalıdır. Doğal olarak deneyde antibiyotik verilmeyen kontrol fareler de kullanılır. Deney farelerine antibiyotik uygulandığı zaman t=0 olarak kabul edilerek antibiyotik konsantrasyonunun MIC altına düşmesi için geçen süre M, deney farelerinin budunda M zamanında saptanan canlı bakteri sayısının 10 kat ($1 \log_{10}$) artması için geçen süre T, kontrol farelerde bakteri sayısının 10 kat artması için geçen süre C olarak gösterildiğinde in-vivo PAE

$$PAE = T - C - M$$

formülü ile saptanır.

Görüldüğü gibi in-vivo PAE'yi ölçmek oldukça zordur ve bir antibiyotik-bakteri çifti için 50'nin üzerinde fare kullanılmasını, titiz bir çalışmayı gerektirir. In-vivo PAE'yi belirlemek için tavşan menenjit modeli(44), sıçan endokardit modeli(24) kobay pnömoni modeli(27), tavşan sırt derisi altına doku kafesleri yerleştirme yöntemi(37) gibi çeşitli yöntemler de denenmiştir.

PAE'nin saptandığı deneylerin hemen hepsinde antibiyotik kültürden ya da dokudan tam uzaklaştırılmamakta ve MIC'un çok altında da olsa ortamda bir miktar antibiyotik kalmaktadır. Bu sub-MIC antibiyotik miktarının sonucu etkilemediğini bildiren yayınların(43) yanında daha uzun PAE saptanmasına yol açtığını bildiren yayınlar da vardır. Bu yayınlarda sub-MIC'daki antibiyotiğin bakteri üremesine etkisiz ya da az etkili olmasına karşılık önceden MIC üstünde antibiyotikle temas etmiş ve dolayısıyla PAE süresi içinde bulunan bakterilerin duyarlılığının arttığı, ortamda sub-MIC'da da olsa rezidü antibiyotik bulunmasının daha uzun PAE elde edilmesine neden olduğu gösterilmiştir(39,56,59). *S.aureus* ve yeni bir asilüreido-penisilin olan aspoksisinilin kullanıldığı bir çalışmada farelerde dokudaki konsantrasyon MIC altına düştüğünde rezidü antibiyotik penisilinazla inaktive edilirse PAE süresinin bir miktar kısaldığı, dolayısıyla in-vivo

ölçülen PAE'nin bir kısmının dokudaki sub-MIC'daki antibiyotikten ileri geldiği gösterilmiştir(39).

PAE'nin hangi mekanizma ile oluştuğu tam olarak anlaşılmış değildir. MIC üzerindeki antibiyotik konsantrasyonu ile temas süresinde antibiyotiğin bakteride bir reseptörle birleşmesinin öldürücü olmayan fakat üremeyi durduran bir etki göstermesi, ortamdaki antibiyotik uzaklaştırıldığı da bu reseptörden ayrılana kadar üremenin inhibisyonunun devam etmesi ileri sürülen bir görüştür(5). Beta-laktam antibiyotiklerin PAE gösterdikleri Gram pozitif koklarda PBP'lere sağlam bir şekilde bağlanması ve kolay ayrılmaması, buna karşılık PAE göstermedikleri Gram negatif çomaklarda küçük bir proteine gevşek olarak bağlanıp kolay ayrılması da bu görüşü destekler(13). Ancak aminoglikozidlerin ribozomlara kalıcı olarak bağlanmasına rağmen bir süre sonra PAE'nin sonlanması, soğukta eritromisinin ribozomlardan ayrılmasına rağmen *S.pneumoniae* üzerindeki PAE'nin devam etmesi bu görüşle açıklanamayan örneklerdir(10). Kinolonlarda PAE süresinin antibiyotikle temas etmiş bakteride DNA sentezinin normale dönmesi için gereken süre olduğu gösterilmiştir(16).

Çeşitli bakteri-antibiyotik çiftlerinde ve değişik çalışmalarda farklı sonuçlar alınabilmekte beraber belirli antibiyotik gruplarının Gram pozitif ve negatif bakterilere PAE göstermeleri konusunda bazı genellemeler yapılabilir. Örneğin, bazı ayrıcalıklarla, beta-laktamlar ve vankomisin gibi hücre duvarının sentezini inhibe eden antibiyotikler Gram pozitif koklar üzerine PAE gösterir fakat Gram negatif çomaklara göstermezler; aminoglikozidler, tetrasiklin, kloramfenikol, rifampin, eritromisin, klindamisin, kinolonlar gibi protein, RNA veya DNA sentezini inhibe eden antibiyotikler ise hem Gram pozitif koklar, hem Gram negatif çomaklar için PAE gösterir. Bu arada imipenem, diğer beta-laktam antibiyotiklerin aksine, *P.aeruginosa* üzerine de bakteri yoğunluğunun düşük olduğu durumlarda PAE göstermekte, fakat bu etki bakteri yoğunluğu artınca azalmakta veya kaybolmaktadır(38).

PAE süresi içinde bakterinin üremesinin yavaşlamasından başka etkiler de görülür. Örneğin bu dönemde lökositlerin bakteriyi öldürücü etkisi artar (postantibiotic leukocyt enhancement, PALE)(33,41). Trombositlerin salgıladığı bir protein antibiyotiklerin *S.aureus*'a gösterdiği PAE'yi artırır(58). PAE süresinde *E.coli*'nin hemolitik aktivitesi baskılanır(17). PAE süresi içindeki bakterilere diğer antibiyotiklerin öldürücü etkisi azalır(5,55).

Penisilin ve ampisilin in-vitro PAE gösterdikleri *S.pneumoniae* için in-vivo PAE saptanmaması(6) dışında diğer antibiyotik-bakteri çiftleri için in-vivo PAE süresi genellikle in-vitro PAE'den daha uzundur(8,36,58).

Aside dirençli bakterilerle az çalışılmış olmasına rağmen PAE'nin bu grup bakteriler için de söz konusu olduğu, bir çalışmada isoniazidin *M.tuberculosis* için 2 günlük PAE göstermesi ile saptanmıştır(1). PAE antifungal ilaçlar ve mantarlar için de geçerlidir. Mantarlar söz konusu olunca postantifungal etki (PAFE) deyimini kullanılır. Çeşitli maya türleri için amfoterisin B'nin 3-10 saatlik PAFE gösterdiği, mikokonazol ve ketokonazol ile ise hiç veya çok az PAFE saptandığı bildirilmiştir. 5-fluorisitozinin *C.albicans* üzerine konsantrasyon ve süreyle bağımlı PAFE gösterdiği saptanmıştır(46).

Antibiyotik kombinasyonları PAE yönünden antagonist, indifferent veya sinerjistik etkili olabilirler. Örneğin teikoplanin fusidik asitle kombine edildiğinde PAE süresi kısalır(7). Trimetoprim ve rifampin kombinasyonu ise indifferent etki gösterir(5). Amikasin ile seftazidim, seftriakson veya piperasilinin kombine edilmesi *P.aeruginosa* ve *S.marcescens* için(26) ve *E.faecalis* için(25) sinerjistik PAE göstermiştir. 10 mg/l konsantrasyonda penisilin veya gentamisin bir *E.faecalis* suşu için sırası ile 2.4 saat ve 0.5 saatlik PAE gösterdiği bir çalışmada, bu iki antibiyotik bir arada kullanıldığında hem bakterisidal etkinin arttığı, hem PAE'nin 5.9 saate çıktığı saptanmıştır(57). Mesilinamun ampisilin, aztreonam, seftazidim, piperasilin ile kombinasyonunun da PAE süresini çok uzattığı gösterilmiştir(20).

Endokardit gibi infeksiyonlar veya nötrojenik hastalardaki infeksiyonlar gibi bakterisidal etkinin arandığı durumlarda bakterinin infeksiyon odağındaki üremesinin durdurulması vücut savunma mekanizmalarının etkisi ile bakteri sayısının azalması sonucu tedaviyi sağlayabilmektedir. Bu gibi hallerde eğer kullanılan antibiyotik etken bakteriyeye PAE göstermiyorsa başarılı bir tedavi için infeksiyon odağında antibiyotiğin hep MIC üstünde bulunmasının sağlanması gerekir. Eğer antibiyotiğin etken bakteriyeye PAE'si varsa, bir sonraki dozun uygulanması için, antibiyotik

konsantrasyonu MIC'nun altına düşüldükten sonra PAE süresi kadar daha beklenebilir. Yani dozlar arası "MIC'nun üstünde kalınan süre + PAE süresi" olarak açılabilir. Hayvan deneyleri bu düşüncüyü doğrulamaktadır. Örneğin sefazolinle PAE göstermediği *E.coli* infeksiyonunun tedavisi için iki doz arasındaki sürenin en az % 90'ında MIC üstünde antibiyotik konsantrasyonu sağlamak gerekirken, PAE gösterdiği *S.aureus* infeksiyonunun tedavisi için iki doz arasındaki sürenin % 50-60'ında MIC üstünde kalmak yeterli olmaktadır(18).

İnsanlardaki infeksiyonlarda yapılan az sayıdaki çalışmalar da bir infeksiyonda etken üzerine PAE'si olan bir antibiyotikle yapılan tedavide doz aralarının açılabilirliğini göstermiştir(15,28). Örneğin ciddi infeksiyonlarda sisomisin 6-8 saatte bir uygulanması devamlı infüzyonu kadar iyi sonuç vermiştir(9). Hemen bütün bakterilere PAE gösteren aminoglikosidlerin daha seyrek dozlar halinde uygulanması hem tedaviyi sağlayacak, hem daha az nefrotoksik ve muhtemelen daha seyrek ototoksik yan etkiye neden olacak gibi görülmektedir(40).

Bunun yanında antibiyotiğin MIC üstü konsantrasyonları ile temas etmiş bakterilerin antibiyotik uzaklaştırıldıktan sonra bir süre hiç üreyemedikleri bir lag (gizli gelişme) dönemine girdikleri, filaman şekilleri aldıkları, PAE süresinin sonuna doğru ise çok süratli bölünerek kısa bir sürede canlı bakteri sayısındaki 10 kat artışı sağladıkları (örneğin kontrol kültüründe jenerasyon süresi 38.7 dakika olan bir *S.aureus*'un 4xMIC siprofloksasin ile 1 saat temas ettiği deneyde lag fazından sonra PAE süresinin sonuna doğru jenerasyon süresinin 9.3 dakikaya indiği) bildirilmiş ve doz aralarının belirlenmesinde MIC üzerinde kalınan süreye PAE süresinin değil, lag fazının süresinin eklenmesinin daha uygun olacağı ileri sürülmüştür(23).

PAE konusunda ülkemizde çok az çalışma yapılmıştır. Benim erişebildiğim 2 çalışmadan birinde Gürdal ve ark(19) ortamda 5 mM Mg⁺⁺ bulunmasının ofloksasinin PAE süresini yarı yarıya kısalttığını, diğerinde Germeyan(11) siprofloksasinin *K.pneumoniae* suşları üzerine PAE'sinin, konsantrasyonun 1xMIC ile 25xMIC arasında artırılması veya temas süresinin 1-3 saat arasında artırılması ile 0.2 saatten 4.2 saate kadar uzadığını bildirmiştir.

BAKTERİLERDE ANTİBİYOTİKLERE KARŞI TOLERANS

Bakterilerde antibiyotik toleransı, bir bakterinin antibiyotiğin öldürücü etkisine daha dayanıklı olması, başka bakteri türlerine ya da aynı türden başka suşlara bakterisid etkili bir antibiyotiğin toleran bakteriyeye sadece bakteriyostatik etki göstermesidir.

Tolerans olayı, genellikle beta-laktam antibiyotiklerde MIC'un hemen üstündeki antibiyotik konsantrasyonlarında bakterinin ölmesine karşılık çok daha yüksek konsantrasyonlarda bakteri ölümünün azalması şeklindeki Eagle fenomeninden, bir bakterinin üremesinin inhibe olduğu antibiyotik konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon etkisinin kaybolup üreyebilmesi şeklindeki paradoksal antibiyotik etkisinden, bazı bakterilerde antibiyotiğin bakterisid konsantrasyonlarında kültürdeki bakterilerin binde birden azının canlı kaldığı persistans olayından farklı bir olaydır (Bak 50). Bir bakterinin bir antibiyotiğe toleran olmasıyla duyarlı veya dirençli olması arasında da bir ilişki yoktur. Duyarlı bir bakteri düşük olan MIC'un hemen üstündeki antibiyotik konsantrasyonlarında ölüyorsa duyarlı ve toleranssız, MIC'un birçok katı konsantrasyonda ölmüyorsa duyarlı fakat toleran; dirençli bir bakteri esasen yüksek olan MIC'un hemen üstündeki konsantrasyonlarda ölüyorsa dirençli fakat toleranssız, yüksek MIC'un da birçok katı konsantrasyonda ölmüyorsa dirençli ve toleran demektir(21).

Bir bakteri suşunun bakterisid etkili bir antibiyotiğe toleran olup olmadığı logaritmik üreme fazındaki kültüre MIC'un 8-10 katı konsantrasyonda antibiyotik ilavesinden sonra periyodik olarak canlı bakteri sayımı yapılarak zaman-ölüm grafiğinin çizilmesi ile anlaşılır. Toleran bakterilerde canlı bakteri sayısı yavaş bir şekilde azalırken toleranssız bakterilerde canlı bakteri sayısı süratle azalır. Ancak toleransı belirlemede en uygun yöntem olan bu işlemin iki önemli dezavantajı vardır. Birinci dezavantaj pratik olmaması, laboratuvara iş ve masraf yükü getirmesidir. İkinci dezavantajı ise yöntemin standardize edilmemiş olması, çeşitli suşları birbirine göre daha az, ya da daha fazla toleran olarak derecelendirmek mümkün olsa da, bir suşa ne zaman toleran deneceği ve toleransın derecesi konusunda bir ölçüt bulunmamasıdır(52). Çok sayıda suşla yapılan bir duyarlılık deneyinde disk etrafında hiç inhibisyon zonu oluşmaması ile çok geniş zon oluşması arasında çeşitli genişlikte zonlar oluşması, ya da MIC belirlenmesinde çok düşük ile çok yüksek konsantrasyonlar arasında her konsantrasyonun MIC olarak saptanabilmesi gibi tolerans belirlenmesi için çir-

zilen ölüm-zaman grafiğinde de çok yatık ve çok dik eğriler arasında her eğimde eğri elde edilir. Ancak duyarlılık deneylerinde dokuda erişilen antibiyotik konsantrasyonuna göre suşun duyarlı ve ya dirençli olarak kabul edilmesini sağlayan sınır değerler belirlendiği halde tolerans için belirli standartlar belirlenmiş değildir.

Laboratuvarda toleran suşların daha kolay belirlenmesi için önerilen ve birçok çalışmada kullanılan bir yöntem MIC'un 32 katı antibiyotik konsantrasyonunda 24 saatte inokulumdaki bakterilerin % 0.1'inden fazlasının canlı kaldığının gösterilmesidir(21,48). MIC belirlenmesinde ayarlı bir inokulum kullanılırsa 24 saat sonra üreme olmayan (MIC) altıncı tüpten (32xMIC) belirli miktar katı besiyerlerine yayılır ve oluşan koloni sayısından inokulumdaki bakterilerin % 0.1'inden fazlasının canlı kalıp kalmadığı (% 99.9'unun veya daha azının öldüğü) kolayca hesaplanabilir(50). Bu yöntem, 24. saatteki bir kesiti göstermesi, bu 24 saat içinde bakteri ölümlütünün çok yavaş seyrettiği toleran suşlarla bakterilerin büyük çoğunluğunun çabuk öldüğü fakat bir kısmının 24 saatte de canlı kaldığı (persistan oranı yüksek), toleran sayılmaması gereken suşları ayırmamasına rağmen pratik oluşu nedeniyle çok sık olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde MIC üstündeki antibiyotik konsantrasyonlarında süratle ölmesine rağmen yüksek konsantrasyonlarda ölümün azaldığı Eagle fenomeni de sonuçları yanıtabilir. Bazı araştırmacılar tolerans işareti olarak 24 saatte canlı kalan bakteriler için \geq % 0.1'den farklı oranlar kullanılmakta, örneğin streptokoklar için 24 saat sonra \geq % 0.15(35,54), stafilokoklar için \geq % 0.2(12,54) canlı bakteri sayısını geçerli saymaktadırlar.

Toleransı belirlemek için kalıp çıkarma (replica plating), MIC'un 5-10 katı MIC'da 5-6 saatte ölen bakteri oranının saptanmasına dayanan ve bir gün içinde sonuç veren yöntemler(52) de tarif edilmiş fakat bunlar da yeterince standardize edilememiştir.

Tolerans bakterinin genetik bir özelliğidir, bir bakterinin toleran olması genetik şifresinde kayıtlıdır. Transformasyon ile bu özellik toleran *S.pneumoniae* suşlarından toleran olmayan suşlara aktarılabilir. Toleran olma özelliğinin dirençlilik özelliği ile beraber veya tek başına aktarılabilmesi iki özelliğin farklı genetik lokuslarda kodlandığını göstermektedir(30). Enterokok suşlarında penisiline toleransın intrinsik olduğu kabul edilmesine ve antibiyotiklerin çok kullanıldığı ülkelerde hemen bütün enterokok suşlarının penisiline toleran bulunmasına rağmen antibiyotik kullanılmamış bir toplumdaki elde edilen suşların toleranssız olduğu, bu suşlar aralıklı olarak penisiline karşılaştırılınca tolerans kazandığı ve kazanılmış toleransın genetik olarak jenerasyondan jenerasyona geçtiği, artık penisilinsiz ortamda da bu suşların toleran olma özelliklerini kaybetmediği saptanmıştır(60). Bir başka çalışmada 135 viridans streptokok suşundan 15'i (% 11) penisiline toleran iken penisilin artan konsantrasyonlarına maruz bırakılması ile 51 suş daha toleran hale geçmiş ve toleran suş sayısı 66'ya (% 49) çıkmıştır(54). Aynı çalışmada aynı yöntemle doğal olarak birinin toleran olduğu 20 *S.aureus* suşunda ilave bir suşta, birinin toleran olduğu 17 koagulaz negatif stafilokok suşunda ilave 2 suşta, hiç toleran suş bulunmayan 17 hemolitik streptokok suşunun 3'ünde penisiline tolerans oluşturulabilmiş, 5 *S.pneumoniae* suşunda toleran olana rastlanmamış ve tolerans indüklenememiştir.

Toleran bir suş beta-laktam antibiyotiklerin öldürücü etkisine olduğu gibi, bu antibiyotiklerin etkisi ile hücre duvarı eriyen bir bakterinin canlılığını muhafaza etmesi mümkün olmayacağından, eritici (litik) etkisine de dirençli olmalıdırlar. Nitekim bakterilerde antibiyotik toleransının ilk saptanışı bazı *S.pneumoniae* suşlarının penisiline lizise uğramadığının gözlenmesi ile mümkün olmuştur(49). Bakterilerin beta-laktam antibiyotiklerce eritilmesinde kendi litik enzimleri (otolizinerleri) rol oynar. Bu enzim aktivitesi azalmış veya kaybolmuş lyt⁻ mutantlar antibiyotik etkisi ile ölür fakat erimezler. Toleran bakterilerde zorunlu olarak otolizinin aktivitesinin de azalması toleransı sağlayan genetik mekanizmanın otolitik aktiviteyi de kontrol ediyor olması ile açıklanmaktadır(21).

Bakterilerde tolerans dendiğinde yukarıda açıklanan ve bir türün bazı suşlarında, kültürün içinde bulunduğu fizyolojik koşullardan bağımsız olarak bulunan tolerans anlaşılır. Bunun yanında bütün bakterilerde ya da bir bakteri türünün bütün suşlarında antibiyotiklerin öldürücü etkisine daha dirençli, yani toleran olmasını sağlayan belirli fizyolojik koşullar vardır. Bu koşullar altında ortaya çıkan toleransa fenotipik tolerans denir. Örneğin beta-laktam antibiyotikler üremekte olan bakterilere bakterisid etkilidir. Bakterinin üremesinin durduğu stasyoner fazdaki ya da üremenin

çok yavaşladığı koşullardaki bakteriler beta-laktam antibiyotiklere fenotipik tolerans gösterirler. İmipenem diğer beta-laktamlardan farklı olarak üremesi yavaşlamış, hatta üremeyen bakterilere de öldürücü etkili olan, kendisine fenotipik tolerans görülmeyen bir antibiyotiktir. Bakterisid antibiyotiklerin üremeyen bakteriler üzerine öldürücü etkilerinin mukayesesi için belirli bir süre besinsiz bırakılan kültürlerde canlı bakterilerin en az % 90'ını öldüren en düşük konsantrasyon (MnBC) veya 10 MIC antibiyotik konsantrasyonunda 24 saatte bakterinin % 10'unun canlı kalması için besinsiz bırakılması gereken en kısa süreyi (tolerans penceresi) belirleme gibi yöntemler geliştirilmiştir (Bak 50). Genetik toleranstan farklı bir mekanizmaya dayanmakla beraber, bütün diğer olaylar gibi, fenotipik toleransın da belirli koşullarda bakterinin belirli davranışlar göstermesini sağlayan genetik temelleri vardır. Örneğin *Bordetella pertussis*'in virulan (vir⁺) suşlarının penemler dışında beka-laktam antibiyotiklere fenotipik tolerans göstermesi vir gen lokusu ile ilgilidir(53). Avirulan (vir⁻) suşlarda 2 saat kadar olan jenerasyon süresi vir⁺ suşlarda 6 saate kadar uzamıştır ve bu gen lokusu muhtemelen hücre duvarı hidrolazlarını da kontrol etmekte, vir⁺ suşlarda otolizinleri inhibe ederek hücre duvarı degradasyonunu yavaşlatmakta, bu etkileri ile virulan *B.pertussis* suşlarında fenotipik toleransın ortaya çıkmasını sağlamaktadır.

Bütün bakterilerde fenotipik toleransa yol açan üremenin yavaşlaması veya durması koşulunun yanında bazı özel koşullar bazı bakteri türlerinde fenotipik toleransa yol açmaktadır. *S.aureus*, *S.pneumoniae*, B grubu streptokoklar, *E.coli* düşük pH'da; *E.faecalis* serum, lipotai-koik asit, kardiolipin veya Forssman antijeni varlığında; G grubu ve viridans streptokoklar ve *L.monocytogenes* koyu inokulum kullanıldığında fenotipik tolerans gösterirler(21).

Fenotipik tolerans bakterilerde genetik toleransın saptanmasında bazı karışıklıklara yol açmakta ve literatürde çok farklı sonuçlar bildirilmesine neden olmaktadır Bir türde tolerans aranmasında logaritmik üreme fazında olmayan kültürler veya o tür için fenotipik toleransa yol açan özel koşullardaki kültürler kullanılırsa suşların hepsi veya pek çoğunun toleran olarak belirlenmesi doğaldır. Nitekim *S.aureus* suşlarında penisilinlere çok kere % 30 - % 70 arasında tolerans saptanırken literatürde % 0 ile % 100 arasında, B grubu streptokoklarda % 4 - % 80 arasında, *S.pyogenes*'de % 16 - % 92 arasında değişen sonuçlara rastlanmaktadır(21,54).

Bakterilerde antibiyotik toleransı genelde beta-laktam antibiyotikler ve hücre duvarı sentezini inhibe eden diğer bakterisid antibiyotiklerle Gram pozitif bakteriler arasında saptanan bir olaydır. Stafilokok ve streptokoklarda, enterokoklarda, laktobasillerde, *L.monocytogenes*, *C.perfringens* ve *B.subtilis*'de antibiyotik toleransı bildirilmiştir. Antibiyotiklerin fazla kullanılması toleran suşların seleksiyonunu sağlamakta ve toleran olmayan suşlarda toleransı indüklemektedir. Hastanede alınan infeksiyonlarda eikenin toleran olması, hastanede kalış süresi uzadıkça böyle suşlarla infekte olma olasılığı artmaktadır (Kaynak için bak 50).

Bu konuda yaptığımız bir çalışmada metisiline dirençli 50 *S.aureus* (MRSA) suşundan sefazolin, sefoperazon, sefotaksim, seftriakson ve vankomisine in-vitro duyarlı bulunanlarda bu antibiyotiklere tolerans aranmıştır(45). Bilindiği gibi MRSA suşları diğer beta-laktam antibiyotiklere in-vitro deneylerde duyarlı bulunabilmekte, fakat MRSA suşlarla olan infeksiyonların bu antibiyotiklerle tedavisi başarısız olduğu için bu suşların diğer beta-laktam antibiyotiklere duyarlılığı çok defa laboratuvarca raporlara yazılmamaktadır. Bu çalışmada da 50 MRSA suşunun tamamı vankomisine duyarlı bulunurken 26-31'i denenen 4 sefalosporine duyarlı işaretli MIC değerleri vermiştir. Duyarlı MIC değerleri alınan suşlarda 24 saatte en az % 99.9 ölüme neden olan konsantrasyon MBC olarak saptanmış ve MBC/MIC ≥ 32 olan suşlar, daha sonra ölüm-zaman grafiği inceleneceğinden "olası toleran" olarak kabul edilmiştir. Olası toleran kabul edilen suşların 8 x MIC antibiyotik konsantrasyonunda ölüm-zaman grafiği çizilmiş ve 24 saatte inokulumdaki bakterilerin binde birinden fazlası canlı kalmışsa (canlı bakteri sayısındaki azalma $3 \log_{10}$ 'dan azsa) suş yüksek derecede toleran, canlı sayımda azalma 3-5 \log_{10} ise az toleran, daha azsa toleranssız olarak kabul edilmiştir. Bu durumda tamamı vankomisine duyarlı olan 50 MRSA suşunun 19'u olası toleran, bunların 4'ü yüksek derecede, 4'ü az toleran olarak bulunmuştur. 50 MRSA suşunda sefalosporinlere in-vitro duyarlı, olası toleranslı, yüksek derecede toleranslı ve az toleranslı bulunan suş sayıları seftriakson için sırasıyla 28, 7, 6 ve 1; sefotaksim için 28, 15, 7 ve 3; sefoperazon için 26, 9, 5 ve 1; sefazolin için 31, 6, 4 ve 1 olarak saptanmıştır.

Gram negatif bakterilerde tolerans olayına rastlanmadığı, bilinen tek olayın laboratuvarında elde edilen toleran bir *E.coli* mutanlığı olduğu(29) bildirilmesine rağmen, daha sonra MBC/MIC oranı ile çeşitli Gram negatif bakterilerin değişik antibiyotiklere toleran bulunduğunu ileri süren yayınlar da vardır. Örneğin septisemili hastalardan Kanada'da izole edilen 941 Gram negatif çöcek şeklinde bakterinin antibiyotik duyarlılığı ile ilgili bir çalışmada kloramfenikole suşların % 3.3'ünün, TMP/SMZ'a % 1.4'ünün, çeşitli beta-laktam antibiyotiklere ve aminoglikosidlere % 0.1-% 3'ünün toleran (MBC/MIC \geq 32) olduğu bildirilmiştir(4). Bu suşların ölüm-zaman grafikleri çizilmediğinden sonuçları kesin kabul etmek zordur. Virulan *B.pertussis* suşunun penemler dışındaki antibiyotiklere toleran bulunması yavaş üremesi sonucu ortaya çıkan fenotipik toleranstan kaynaklanmaktadır(53).

Toleransın klinik önemini tam olarak belirlemek için daha birçok çalışmaya gereksinim vardır. Endokardit, meninjit, osteomyelit, derin doku abseleri gibi infeksiyonlarda ya da bağışıklık yetersizliği olan ve nötropenik olan hastalarda kullanılan antibiyotiklerin bakterisid etkili olması istenir. Etken olan bakteri toleran ise bakterisid etki sağlanamayacak, tedavi olumsuz etkilenecektir. Nitekim enterokok endokarditinde bir beta-laktam antibiyotikle birlikte bir aminoglikosidin kullanılmasının mantığında enterokokların beta-laktamlara toleran olması da yatar. Toleran bakterilerle oluşan infeksiyonların daha zor tedavi edilebildiği çeşitli hayvan modelleri ile gösterilmiştir. Tavşan endokardit modelinde kalp kapakçıkları travmatize edilmiş tavşanlarda önce penisilin, sonra penisiline toleran olan ve olmayan *S.sanguis* suşları injekte edilince toleran suşla tavşanların % 63'ünde, toleran olmayan suşla % 9'unda endokardit gelişmiştir(22). Bir diğer çalışmada toleran olmayan *S.sanguis* suşu ile oluşturulan endokarditi 23 tavşanın 10'u 5 günlük penisilin ile tedavi edilebilmişken, toleran suşla infekte edilen 36 tavşanın hiçbiri tedavi edilememiştir(3). Toleran olan ve olmayan *S.aureus* suşları ile hayvanlarda oluşturulan endokardit ve piyelonefrit deneyleri de toleran suşlarla olan infeksiyonların tedavisinin daha zor olduğunu göstermiştir (Bak 52).

İnsanlarda da toleran suşlarla olan infeksiyonların tedaviye daha az cevap verdiğini bildiren çalışmalar vardır(21). Toleran *S.aureus* suşları ile oluşan bakteriyemi olgularında tedaviye cevabın toleran olmayan suşlardaki gibi olmasına karşılık, toleran suşlarla oluşan endokardit olgularında ateşin daha uzun sürdüğü, yoğun bakıma daha sık gereksinim doğduğu, daha fazla komplikasyon görüldüğü bildirilmiştir(42).

Bu bulgular bakterilerde antibiyotiklere karşı tolerans bulunmasının klinik önemi olduğunu desteklemektedir. Ancak endokardit, derin doku infeksiyonları, intraselüler üreyen bakterilerle oluşan infeksiyonlarda bakterilerin genellikle yavaş üremesi, bakteri yoğunluğunun çok fazla olabilmesi veya fagositler içindeki düşük pH gibi nedenlerle birçok bakteride esasen fenotipik toleransın ortaya çıkması da genetik toleransla beraber düşünülmesi gereken bir olaydır.

KAYNAKLAR

- 1- Beggs W H, Jenne J W: Isoniazid uptake and growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* in relation to time and concentration of pulsed drug exposures, *Tubercle* 50:377 (1969).
- 2- Bigger J W: The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*, *Ir J Med Sci* 227:533 (1944).
- 3- Brennan R O, Durack D T: Therapeutic significance of methicillin tolerance in experimental streptococcal endocarditis, *Antimicrob Agents Chemother* 23:273 (1983).
- 4- Chamberland S, L'Ecuyer L, Lessard C, Bemier M, Provencher P, Bergeron M G and the Canadian Study Group: Antibiotic susceptibility profiles of 941 Gram-negative bacteria isolated from septicemic patients throughout Canada, *Clin Infect Dis* 15:615 (1992).
- 5- Craig W A, Gudmundsson S: The postantibiotic effect, "Lorian V (ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2nd ed" kitabında s.515, Williams and Wilkins, Baltimore (1984).
- 6- Craig W A, Vogelmann B: The postantibiotic effect, *Ann Intern Med* 106: 900 (1987).
- 7- Drabu Y J, Blakemore P H: The post-antibiotic effect of teicoplanin: monotherapy and combination studies, *J Antimicrob Chemother* 27(Suppl B):1 (1991).
- 8- Fantin B, Ebert S, Leggett J, Vogelmann B, Craig W A: Factors affecting duration of in-vivo postantibiotic effect for aminoglycosides against Gram-negative bacilli, *J Antimicrob Chemother* 27:829 (1990).

- 9- Feld R, Valdivieso M, Bodey G P, Rodriguez V: A comparative trial of sisomicin therapy by intermittent versus continuous infusion, *Am J Med Sci* 274:179 (1977).
- 10- Gerber A U, Craig W A: Growth kinetics of respiratory pathogens after short exposures to ampicillin and erythromycin in vitro, *J Antimicrob Chemother* 8:S81 (1981).
- 11- Germeyan H: Ciprofloxacin'in Klebsiella pneumoniae suşları üzerindeki postantibiyotik etkisinin (PAE) değişik in vitro koşullarda, çeşitli yöntemlerle araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Marmara Üniversitesi, İstanbul (1990).
- 12- Goessens W H F, Fontijne P, van Raffe M, Michel M F: Tolerance percentage as a criterion for the detection of tolerant Staphylococcus aureus strains, *Antimicrob Agents Chemother* 25:575 (1984).
- 13- Gorgopapadakou N H, Kiu F Y: Penicillin-binding proteins in bacteria, *Antimicrob Agents Chemother* 18:148 (1980).
- 14- Gottfredsson M, Erlendsdottir H, Gudmundsson S: Quantitation of postantibiotic effect by measuring CO₂ generation of bacteria with the BACTEC Blood Culture System, *Antimicrob Agents Chemother* 35:2658 (1991).
- 15- Grafford K, Nilsson B S: Twice daily dosage of bacampicillin: a summary of clinical documentation, *J Antimicrob Chemother* 8:S119 (1981).
- 16- Guan L, Blumenthal R M, Burnham J C: Analysis of macromolecular biosynthesis to define the quinolone-induced postantibiotic effect in Escherichia coli, *Antimicrob Agents Chemother* 36:2118 (1992).
- 17- Guan L, Burnham J C: Postantibiotic effect of CI-960, enoxacin and ciprofloxacin on Escherichia coli: effect on morphology and haemolysin activity, *J Antimicrob Chemother* 29: 529 (1992).
- 18- Gudmundsson S, Vogelman B, Craig W A: The post-antibiotic effect-Relevance to clinical practice, *Insights into the Treatment of Serious Infections* 2(1):61 (1988).
- 19- Gürdal H, Tulunay F C, Altay G: Post antibiotic effect of ofloxacin and the activity of Mg⁺⁺, *J Antimicrob Chemother* 26:291 (1990).
- 20- Hanberger H, Nilsson L E, Svensson E, Maller R: Synergic post-antibiotic effect of mecillinam, in combination with other beta-lactam antibiotics in relation to morphology and initial killing, *J Antimicrob Chemother* 28:523 (1991).
- 21- Handwerker S, Tomasz A: Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria, *Rev Infect Dis* 7:368 (1985).
- 22- Hess J, Dankert J, Durack D T: Significance of penicillin tolerance in vivo: prevention of experimental Streptococcus sanguis endocarditis, *J Antimicrob Chemother* 11: 555 (1983).
- 23- Howard B M A, Pinney R J, Smith J T: Contributions of post-antibiotic lag and repair-recovery to the post-antibiotic effects of ciprofloxacin on Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes, *Chemotherapy* 39:22 (1993).
- 24- Ingerman M J, Pitsakis P G, Rosenberg A F, Lerison M E: The importance of pharmacodynamics in determining the dosing interval in therapy for experimental Pseudomonas endocarditis in the rat, *J Infect Dis* 153:707 (1986).
- 25- Isaksson B, Hanberger H, Maller R, Nilsson L E, Nilsson M: Synergistic postantibiotic effect of amikacin and beta-lactam antibiotics on Enterococcus faecalis, *J Antimicrob Chemother* 27 (Suppl B):9 (1991).
- 26- Isaksson B, Hanberger H, Maller R, Nilsson L E, Nilsson M: Synergic postantibiotic effect of amikacin in combination with beta-lactam antibiotics on Gram-negative bacteria, *J Antimicrob Chemother* 28:25 (1991).
- 27- Kapusnik J E, Gordin F, Scott K, Hackbarth C, Sande M A: Efficacy of once daily versus conventional aminoglycoside therapy for experimental Pseudomonas pneumonia, *Clin Res* 33:A57 (1985).
- 28- Kirby W M M, Craig W A: Theory and application of pulse dosing: a summary of the symposium, *Rev Infect Dis* 3:1 (1981).
- 29- Kitano K, Tomasz A: Escherichia coli mutants tolerant to beta-lactam antibiotics, *J Bacteriol* 140:955 (1979).
- 30- Liu H H, Tomasz A: Penicillin tolerance in multiply drug-resistant natural isolates of Streptococcus pneumoniae, *J Infect Dis* 152:365 (1985).
- 31- Lorian V, Ernst J, Amaral L: The post-antibiotic effect defined by bacterial morphology, *J Antimicrob Chemother* 23:485 (1989).
- 32- Mattie H: Kinetics of antimicrobial action, *Rev Infect Dis* 3:19 (1981).
- 33- McDonald P J, Wetherall B L, Pruul H: Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes, *Rev Infect Dis* 3:38 (1981).
- 34- Meng X, Nightingale CH, Sweeney K R: Quantification of in-vitro post-antibiotic effect based on the mean recovery-time. II: A comparison of colony counting versus photometric methods for the determination of bacterial growth, *J Antimicrob Chemother* 28:515 (1991).

- 35- Michel M F, van Leeuwen W B: Degree and stability of tolerance to penicillin in *Streptococcus pyogenes*, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8:225 (1989).
- 36- Minguez F M, Izquierdo J I, Caminero M M, Martinez F F, Prieto J P: In vivo postantibiotic effect of isepamicin and other aminoglycosides in a thigh infection model in neutropenic mice, *Chemotherapy* 38:179 (1992).
- 37- Odenholt I, Holm S E, Cars O: An in vivo model for evaluation of the postantibiotic effect, *Scand J Infect Dis* 20:97 (1988).
- 38- Odenholt I, Isaksson B, Nilsson L, Cars O: Postantibiotic and bactericidal effect of imipenem against *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8:136 (1989).
- 39- Oshida T, Onta T, Nakanishi N, Matsushita T, Yamaguchi T: Activity of sub-minimal inhibitory concentrations of aspoxicillin in prolonging the postantibiotic effect against *Staphylococcus aureus*, *J Antimicrob Chemother* 26:29 (1990).
- 40- Powell S H, Thompson W L, Luthé M A, Stern R C, Grossniklaus D A, Bloxham D D, Groden D L, Jacobs M R, DiScenna A D, Cash H A, Klinger J D: Once-daily vs. continuous aminoglycoside dosing: efficacy and toxicity in animal and clinical studies of gentamicin, netilmisin, and tobramycin, *J Infect Dis* 147:918 (1983).
- 41- Pruil H, McDonald P J: Lomefloxacin-induced modification of the kinetics of growth of Gram-negative bacteria and susceptibility to phagocytic killing by human neutrophils, *J Antimicrob Chemother* 25:91 (1991).
- 42- Rajashekarajah K R, Rice T, Rao V S, March D, Ramakrishna B, Kallick C A: Clinical significance of tolerant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with endocarditis, *Ann Intern Med* 93:796 (1980).
- 43- Renneberg J, Walder M: Postantibiotic effects of imipenem, norfloxacin and amikacin in vitro and in vivo, *Antimicrob Agents Chemother* 33:1714 (1989).
- 44- Saade M A, Korzeniowski O M, Allegro G M, Brennan R O, Zak O, Scheld W M: Intermittent or continuous therapy of experimental meningitis due to *Streptococcus pneumoniae* in rabbits: preliminary observations on the postantibiotic effect in vivo, *Rev Infect Dis* 3:98 (1981).
- 45- Salman Z, Töreci K: Antibiotic tolerance for ceftriaxone, cefotaxime, cefoperazone, cefazolin and vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, *ANKEM* 6:1 (1992).
- 46- Scalrone G M, Mikami Y, Kurita N, Yazawa K, Miyaji M: The postantifungal effect of 5-fluorocytosine on *Candida albicans*, *J Antimicrob Chemother* 29:129 (1992).
- 47- Shah P M, Hubner K-G, Stille W: In-vitro-Untersuchungen zur intermittierenden Therapie mit Penicillin G und Ampicillin, *Med Welt* 29:888 (1978).
- 48- Sherris J C: Problems in vitro determination of antibiotic tolerance in clinical isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 30:633 (1986).
- 49- Tomasz A, Albino A, Zanati E: Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system, *Nature* 227:138 (1970).
- 50- Töreci K: Bakterilerde antibiyotik toleransı, "Çalangu S, Eraksoy H, Özsüt H (eds): *İnfeksiyon Hastalıkları '92*" kitabında s.39, Yüce Yayınları, İstanbul (1992).
- 51- Töreci K: Antibiyotik sonrası etki (ASE), "Çalangu S, Eraksoy H, Özsüt H (eds): *İnfeksiyon Hastalıkları '92*" kitabında s.241, Yüce Yayınları, İstanbul (1992).
- 52- Tuomanen E, Durack D T, Tomasz A: Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria, *Antimicrob Agents Chemother* 30:521 (1986).
- 53- Tuomanen E, Schwartz J, Stephen S: The vir locus affects the response of *Bordetella pertussis* to antibiotics: Phenotypic tolerance and control of autolysis, *J Infect Dis* 162:560 (1990).
- 54- van der Meer J T M, van Vianen W, Hu B, van Leeuwen W B, Valkenburg H A, Thompson J, Michel M F: Distribution, antibiotic susceptibility and tolerance of bacterial isolates in culture-positive cases of endocarditis in the Netherlands, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10:728 (1991).
- 55- Vogelmann B S, Craig W A: Postantibiotic effects, *J Antimicrob Chemother* 15(Suppl A):37 (1985).
- 56- Winstanley T, Edwards C, Hasting M: Post-antibiotic effect of teicoplanin, *J Antimicrob Chemother* 27:683 (1991).
- 57- Winstanley T G, Hasting J G M: Synergy between penicillin and gentamicin against enterococci, *J Antimicrob Chemother* 25:551 (1990).
- 58- Yeaman M R, Norman D C, Bayer A S: Platelet microbicidal protein enhances antibiotic-induced killing of and postantibiotic effect in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother* 36:1665 (1992).
- 59- Zhanel G G, Karlowsky J A, Hoban D J, Davidson R J: Antimicrobial activity of subinhibitory concentrations of aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa* as determined by the killing-curve method and the postantibiotic effect, *Chemotherapy* 37:114 (1991).
- 60- Zigelboim-Daum S, Wennersten C, Eliopoulos G M, Moellering R C: Induction of tolerance in nontolerant lytic strains of *S.faecalis* from Solomon Islands, *Program and Abstracts of the Twenty-seventh Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Abstract 1027, p.2176, Am Soc Microbiol, Washington (1987).