(Mikrobiyol Bült, 28: 39-42, 1994)

İN VİTRO ISI ARTIŞININ SEFTRİAKSONUN BAKTERİSİDAL ETKİSİ İLE İLİŞKİSİ

THE RELATION BETWEEN IN VITRO TEMPERATURE ELEVATION AND BACTERICIDAL EFFECT OF CEFTRIAXONE

Ünsal ÖZGEN*, Nuran GÜRSES*, İsmail İŞLEK*
Davut ALBAYRAK*, Şükrü KÜÇÜKÖDÜK*, Serap UYSAL*

Özet: Çocukluk yaş grubunda majör semptomlardan biri olan ateşin in vitro karşılığı olan ortam ısı artışının, bakteri ölüm hızını artırdığı ve antibiyotik minimal inhibitör konsantrasyon değerlerini düşürdüğü gösterilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalar yetersiz olup insan vücut ısısı değerlerini kapsamamaktadır. Ayrıca çalışmalarda antibiyotiksiz vasatlar kullanılarak kontrolleri yapılmamıştır. Bu eksikliği tamamlamak ve konuya açıklık getirmek amacı ile yapılan çalışmamızda 37 °C, 39 °C ve 41°C'de seftriakson içeren ve içermeyen vasatlar kullanılarak E.coli ATCC 25922 üzerine seftriaksonun bakterisidal etkisi incelendi. 41 °C'de antibakteriyel etkinliğin 37 °C ve 39 °C'ye göre daha fazla olduğu tespit edildi. (P < 0.05). Çalışmamızın bu sonuçları ile yüksek ortam ısısında antibakteriyel etkinliğin daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Summary: It has been shown that enviromental temperature elevation as an in vitro equivalent of fever, a major symptom in childhood, increases the death of bacteria and decreases minimal inhibitory concentrations of antibiotics. The studies on this topic are not satisfactory and do not include human body temperatures and antibiotic deficient media as controls. In this study bactericidal effects of ceftriaxone on E.coli ATCC 25922 serogroup in temperatures 37 °C, 39 °C and 41 °C has been searched and compared with controls. The antibactericidal effectiveness has been found much more in 41 °C than in 37 °C and 39 °C (P < 0.05). We conclude that bactericidal effects of antibiotics are much more in high temperatures.

* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı.

Geliş tarihi: 18.1.1993 Kabul ediliş tarihi: 12.4.1993

G İ R İ Ş

Çocukluk yaş grubunun majör semptomlarından birisi olan ateşin vücudun nonspesifik immün direncini artırmak ve bakteri üreme hızını azaltmak gibi olumlu etkileri bilinmektedir. Ayrıca antibiyotiklerin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin ortam ısı artışına paralel olarak azaldığı in vitro olarak gösterilmiştir (1-3). Bu çalışmalar insan vücudundaki optimal ve ateşe eşdeğer ısı dereceleriyle tam olarak uyumlu olmayan ortam ısılarında yapıldığı ya da antibiyotiksiz kontrol vasatları kullanılmadığı için değişik yorumlara neden olmuştur (1, 3, 4). Bu nedenle çalışmamızda insan vücut ısısı ile uyumlu olarak in vitro ortamda 37 °C, 39 °C ve 41 °C'de antibiyotikli ve antibiyotiksiz vasatlarda bakteri üreme hızı incelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri sayımı ve süspansiyon hazırlanması: E.coli ATCC 25922 standart suşundan 5 ml Brain Heart Infusion Broth (BHIB) içine pasaj yapıldıktan sonra 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben karıştırılarak spektrofotometre (LKB, Biochrom, Altrospec 4050) ile 620 mm. dalga boyunda (5) süspansiyonun absorbans değeri belirlendi. Elde edilen değer aynı cihazda ve dalga boyunda absorbans değerleri okunan McFarland (6) standartlarının değerleri ile karşılaştırıldı. McFarland standardının absorbansına eşdeğer bakteri sayısı doğru kabul edilerek süspansiyondan 1 ml alındı ve steril serum fizyolojik ile seri dilüsyonları yapıldı (1 X 10^7 dilüsyon). Dilüe numuneden 1 ml alınarak Anti-biogramme Base Agara (Biolife Lab. Milano) ekim yapıldı ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda koloni sayımı yapılarak dilüsyon katsayısı ile çarpıldı ve McFarland standartları ile elde edilen değerlerin sağlaması yapıldı.

Dilüe edilmemiş bakteri süspansiyonundan seri dilüsyonlar yapılarak 0.1 ml'de 10^5 bakteri olacak şekilde ayarlandı. Önceden hazırlanmış içinde 0.8 ml BHIB bulunan steril tüplere bu süspansiyondan 0.1'er ml konuldu. Antibiyotik olarak 0.1 ml'de 0.13 µg (7) seftriakson bulunan steril numune kullanıldı. Bu numuneden her bir tüpe 0.1 ml ilave edildi. Her ısı için 30'ar adet antibiyotikli tüp kullanıldı. Kontrol grubu numuneler, içlerinde 0.9 ml BHIB bulunan steril tüplere 0.1 ml bakteri süspansiyonu konularak hazırlandı ve her ısı için 30'ar tüp kullanıldı.

Numuneler 37 °C, 39 °C ve 41 °C'de etüvde aynı anda 18 saat inkübe edildikten sonra steril serum fizyolojik ile seri dilüsyonları yapıldı ve 1'er ml antibiogramme base agara ekim yapıldı. Vasatlar 24 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapılarak kaydedildi ve dilüsyon katsayısı ile çarpılarak bakteri sayısı hesaplandı.

Bakterinin beta laktamaz aktivitesi kromojenik sefalosporin testi ile çalışıldı (8). İnkübasyonlar için Elektro-Mag 6040 B etüv, istatistiksel çalışmalar için student-t testi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda inkübasyon periyodu sonrası bakteri sayımında Tablo 1'de verilen değerler elde edildi. Antibiyotik içeren vasatlarda 37 °C'de 34.20 ± 2.75 (x 10^3), 39 °C'de 30.07 ± 1.96 (x 10^3), 41 °C'de 24.87 ± 2.10 (x 10^3) bakteri tespit edilirken; kontrol vasatlarında 37 °C'de 301.80 ± 7.04 (x 10^7), 39 °C'de 299.40 ± 6.67 (x 10^7) ve 41 °C'de 290.87 ± 5.66 (x 10^7) bakteri olduğu görüldü.

Tablo 1

İnkübasyon Isılarına Göre Bakteri Sayısının Dağılımı

Gruplar	İnkübasyon Isısı 37C° (X±SH)	39C° (X±SH)	41C°(X±SH)
Antibiyotikli ($1x10^3$)	34.20±2.75	30.07±1.96	24.87±2.10
	t=1.22 P>0.05	t=1.81,P<0.05	
	t=2.70,P<0.05		
Kontrol ($1x10^7$)	301.80±7.04	299.40±6.67	290.87±5.66
	t=0.25 P>0.05	t=0.98,P>0.05	
	t=1.21,P>0.05		

Kontrol vasatlarının 37 °C, 39 °C ve 41 °C'de içerdikleri bakteri sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($P > 0.05$). Antibiyotikli vasatların 37 °C ve 39 °C'deki içerdikleri bakteri sayıları arasında anlamlı fark bulunamazken ($P > 0.05$), 39-41 °C ve 37-41 °C'deki bakteri sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($P < 0.05$). Her ısıdaki antibiyotikli ve kontrol vasatlarındaki bakteri sayıları karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0.05$).

Çalışmamızda kullanılan E.coli ATCC 25922'nin beta laktamaz aktivitesi negatif olarak bulundu.

TARTIŞMA

Ateşin insanlardaki olumlu ve olumsuz etkileri bilinmektedir (9-11). Ateşin in vitro karşılığı ise ortam ısısının yükselmesidir. İn vitro ısı artışının bakteri üreme hızı ve antibiyotik aktivitesini konu alan çalışmalar istenilen seviyede değildir.

Antibiyotik aktivitesinin ısı ile değiştiğine dair ilk gözlem Johnson ve Lewin (1) tarafından E.coli üzerine kinin etkisinin artışının tespitine dayanmaktadır. Muschel ve arkadaşları (1) ise 37 °C'nin üzerindeki bakterilerin antibiyotiklere

hassasiyetinin progressif olarak arttığını bildirmişlerdir. Bates ve Mackillop (4) 38 °C-42 °C'de doku kültür ortamında adriamisinin hücre içine geçişinin ve sitotoksisitesinin arttığını göstermişler, Mackowiak ve arkadaşları (2), 33 °C, 35 °C, 37 °C, 39 °C, 41 °C ve 43 °C'de kontrol grubu olmaksızın bakteri-antibiyotik etkileşimini incelemişler, 43 °C'de bakteri ölümünün daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Manzella (3) ise 35 °C ve 40 °C'de kontrol vasatları kullanarak antibakteriyel etkinliği çalışmış ve bakteri türüne göre farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Mackowiak (1), 35 °C-41 °C'de 432 bakteri suşunda antibiyotik MİK değerlerinin ısı ile etkileşimini araştırmış; 35 °C ve 41 °C'de daha düşük olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmalarda ortam ısıları iyi seçilmemiş ve / veya kontrol grubu kullanılmamıştır.

Çalışmamızda seçilen ısılardan 37 °C normal vücut ısısını, 39 °C klinikte sık rastladığımız ateşi ve 41 °C yüksek ateşi temsil etmektedir. Rektal ısının aksiller ısıya göre 1 °C daha yüksek olduğu (12) dikkate alındığında bu ısıların insanlarda normal ve iki farklı ateş derecelerini temsil ettiği görülmektedir. Sonuçlarımız ise ortam ısısının yükselmesine paralel olarak antibakteriyel etkinliğin arttığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Mackowiak PA, Ruderman AE, Martin RM, et al: Effects of physiologic variation in temperature on the rate of antibiotic induced bacterial killing. Am J Clin, 76: 57-62, 1981.
2. Mackowiak PA, Cason MM, Cohen RL: Effect of temperature on antimicrobial susceptibility of bacteria. J Infect Dis, 145: 550-553, 1982.
3. Manzella JP, Roberts NJ, Robertson RG, et al: Temperature effects of in vitro bacterial growth and antibiotic activity. Clin Res, 27: 349 A, 1979.
4. Bates DA, Mackillop WJ: The relationship between membrane permeability to adriamycin and adriamycin cytotoxicity in cho cells to elevated temperatures. Cancer Lett, 38: 129-135, 1987.
5. Redd H, Christensen RD, Fisher GW: Circulating and storage neutrophils in septic neonatal rats treated with immune globulin. J Infect Dis, 157: 705-712, 1988.
6. Baron JE, Finegold SM: Diagnostic Microbiology. 8th ed. St Louis, Mosby, p: 171-194, 1990.
7. Cleeland R, Squires E: Antimicrobial activity of ceftriaxone: A review. Am J Med, 77 (4C): 3-11, 1984.
8. Anhalt JP, Sabath LD, Barr AL: Manual of Clinical Microbiology. 3rd ed. Washington, American Society for Microbiology p: 478-484, 1980.
9. Rosenthal TC, Silverstein DA: Fever. Postgr Med, 83: 75-84, 1988.
10. Drutz DJ, Mills J: Immunity and infection. p: 167-185. In Stites DP, Stobo JD, Wells JV, (eds): Basic and Clinical Immunology. 1987, 6th ed. Appleton and Lange, Lebanon.
11. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C: Cytokines. p: 78-101. In Stites DP, Terr AL, (eds): Basic and Clinical Immunology, 1991, 7th ed. Appleton and Lange, Lebanon.
12. Weinstein L, Swartz MN: Host response to infection. p: 540-559. In Sodeman TM, (ed): Pathologic Physiology, 1985, 7th ed. Saunders, Philadelphia.