

İdrarın ve glukoz ilave edilmiş idrarın çeşitli antibiyotiklerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine etkisi

The influence of urine and glucose added urine on the in vitro antimicrobial activity of various antibiotics

Nevriye Gönüllü¹, Ömer Küçükbaşmacı¹, Özden Büyükbaba-Boral², Mine Anğ-Küçüker²

¹İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İstanbul, ²İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

İletişim / Correspondence: Nevriye Gönüllü Adres / Address: İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İstanbul Tel: 0212 414 30 00/22462 E-mail: nevrignonullu@yahoo.com

ÖZET

Bu çalışmada idrarın ve glukoz ilave edilmiş idrarın çeşitli antibiyotiklerin in vitro aktivitesi üzerine etkisi buyyonda mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. Beta-laktam antibiyotiklere duyarlı 16 *Escherichia coli* suşu kullanılmıştır. Ampisilin, ampisilin+sulbaktam, sefalotin, sefuroksim, seftriakson, amikasin, siprofloksasin, sulfametoksazol ve trimetoprimin minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK), mikrodilüsyon yöntemi ile paralel olarak Mueller Hinton buyyon, insan idrarı ve glukoz ilave edilmiş insan idrarında (G idrar, glukoz 440mg/dl) araştırılmıştır. Yaklaşık olarak tüm antibiyotiklerin MİK'leri idrar ve glukozlu (G) idrarda, buyyondaki MİK'lere göre daha yüksek bulunmuştur. Ampisilinin MİK₉₀'ı, idrarda sekiz kere, G idrarda ise 32 kere buyyon ortamına göre yüksek bulunmuştur. Seftriakson, siprofloksasin ve trimetoprimin MİK₉₀'ları G idrarda, idrar ortamına göre iki kere yüksek bulunmuştur. Ampisilin+sulbaktam, sefalotin, sefuroksim ve sulfametoksazol için MİK₉₀'lar idrarda ve G idrarda eşit bulunmuştur. Amikasin için MİK₉₀ G idrarda, idrar ortamına göre iki kez düşük bulunmuştur.

Siprofloksasin, sulfametoksazol ve trimetoprim dışında, tüm antibiyotiklere ait sonuçlar buyyon-idrar karşılaştırılması için anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Sulfametoksazol ve trimetoprim dışında, tüm antibiyotiklere ait sonuçları buyyon-G idrar karşılaştırılması için anlamlı bulunmuştur. Sonuçlar idrar-G idrar karşılaştırılması için anlamsız bulunmuştur.

Bu çalışmada bazı antibiyotiklerin aktivitelerinin idrardan ve G idrardan etkilendiği gösterilmiştir. Standard duyarlılık testlerinin, idrar yolu infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan bazı antibiyotiklerin aktivitesini olduğundan daha yüksek gösterebileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: İdrar, glukoz ilave edilmiş idrar, MİK, antibiyotikler

SUMMARY

The influence of urine and glucose added urine on the in vitro activities of various antibiotics was assessed by the microbroth dilution method in this study. Sixteen beta-lactam susceptible *Escherichia coli* isolates were used. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of ampicillin, ampicillin+sulbactam, cephalothin, cefuroxime, ceftriaxone, amikacin, ciprofloxacin, sulfamethoxazole and trimethoprim were performed parallel in Mueller Hinton broth, human urine and glucose added (440 mg/dl glucose) urine by the microbroth dilution method. MICs of nearly all antibiotics were higher in urine and glucose added urine than MICs in broth. MIC₉₀ against ampicillin was 8 fold higher in urine and 32 fold higher in glucose added urine than MIC₉₀ in broth. MIC_{90s} against ceftriaxone, ciprofloxacin and trimethoprim in g-urine were only 2 fold higher than MIC₉₀ in urine. Equal MIC₉₀ in g-urine and urine were obtained for ampicillin-sulbactam, cephalothin, cefuroxime and sulphamethoxazole. Two fold smaller MIC₉₀ in g-urine in comparison with MIC₉₀ in urine were found for amikacin.

The results of statistical analysis were significant ($p<0.05$) for all antibiotics except ciprofloxacin, sulphamethoxazole and trimethoprim for broth-urine comparison. For broth-g-urine the results were significant for all antibiotics except sulphamethoxazole and trimethoprim. The results were found insignificant for urine -g-urine comparison.

This study demonstrated that MICs of antibiotics are influenced by the human urine and glucose added urine. MICs of some antibiotics used in the treatment of urinary tract infections may be overestimated by the standard antibiotic testing methods.

Keywords: Urine, glucose added urine, MIC, antibiotics

GİRİŞ

Erişkinlerin idrar yolu infeksiyonlarının tedavisinde antibiyotikler sıkça kullanılan ilaçlardır. Komplike olmayan idrar yolu infeksiyonları genç sağlıklı kadınlarda daha sık görülmektedir ve tedavileri kolaydır. Bununla birlikte, diyabetli hastalarda idrar yolu infeksiyonları komplike bir seyir göstermektedirler (1).

Diyabet, endokrin hastalıklar arasında en sık görülen hastalıktır. Retinopati, nöropati, nefropati gibi organ komplikasyonlarının dışında, diyabetli hastalar yüksek infeksiyon riski taşımaktadırlar ve bu hasta grubunun infeksiyonları daha ağır seyretmektedir. Diyabetli hastalarda idrar yolu infeksiyonları en sık görülen infeksiyonlar arasında yer alırlar. İdrar yolu infeksiyonlarının, diyabetli hastalar arasında sık görülmesinin nedenleri arasında glikozüri, nötrofillerin anormal fonksiyonu ve üroepitelial hücrelere artmış aderans gösterilmektedir. Glikozüri, diyabetli hastaların idrar yolu infeksiyonlarında önemli bir rol oynamaktadır. In vitro yapılan çalışmalarda, glikozürinin çeşitli *Escherichia coli* suşlarının üremesini arttırdığı bildirilmiş, bununla birlikte bu bulgu in vivo yapılan çalışmalarda kanıtlanamamıştır; bu çalışmalarda, glikozürlü hastalarda, glikozürisiz hastalara göre daha sık bakteriüri olduğu gösterilememiştir (2).

Bazı antibiyotiklerin idrarda neden daha az etkili olduğu sadece pH'nın etkisiyle açıklanamamaktadır. Bu etkinin azalmasına idrarın içinde çözülmüş birçok diğer etkeninde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (1). Yakın zamanda yaptığımız bir çalışmada, antibiyotik MİK'lerinin insan idrarından etkilendiğini ve genel olarak idrarda normal besiyerine oranla daha yüksek olduğunu göstermiştik (3). Glikozürinin ve glukozun antibiyotiklerin antimikrobiyal etkisi üzerine etkisi hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma, idrar yolu infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan bazı antibiyotiklerin aktivitesi üzerine glukozun etkisinin (glikozüriyi taklit ederek) belirlenmesi amacı ile planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteriler. Bu çalışmada idrar yolu infeksiyonu etkeni olan 16 *E.coli* suşu kullanılmıştır. Tüm suşlar beta-laktam duyarlı fenotipindedir.

Antibiyotikler. Çalışmada kullanılan antibiyotikler aşağıda sıralanmıştır: ampisilin, sulfometoksazol, trimetoprim (Fako, İstanbul); ampisilin+sulbaktam (Bilim, İstanbul); sefuroksim (GraxoSmith Kline, İstanbul); seftriakson (Deva, İstanbul); amikasin (Mustafa Nevzat, İstanbul); siprofloksasin (Bayer, İstanbul).

Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK). MİK, saptanmasında Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'ün tarif ettiği mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır (4). Antibiyotiklerin 100'er µl katyon ayarlı Mueller Hinton buyyon, insan idrarı ve glukoz ilave edilmiş (G idrar, glukoz 440 mg/dl) insan idrarı içeren mikropleytlerde çift seri dilüsyonları yapılmıştır. Standard suş olarak *E.coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. Logaritmik üreme fazında bulunan bakteri süspansiyonları yaklaşık 5x10⁵ CFU/ml Mueller Hinton buyyon ve idrar ve glukozlu idrar içeren kuyucukların içine inoküle edilmiştir. 35°C'de 24 saatte üreme olmayan en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak kabul edilmiştir.

İstatistik. İstatistik inceleme Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar Dunn'ın yöntemi ile yapılmıştır.

BULGULAR

Çeşitli antibiyotiklere karşı MİK dağılımı, MİK aralıkları ve MİK₉₀'ları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Yaklaşık olarak tüm antibiyotiklerin MİK'leri idrar ve G idrarda daha yüksek bulunmuştur. Ampisiline karşı MİK₉₀ idrar ortamında sekiz kere, G idrar ortamında ise 32 kere buyyon MİK₉₀'a göre yüksek bulunmuştur. Seftriakson, siprofloksasin ve trimetoprim MİK₉₀'ları G idrarda, idrara göre iki kez yüksek bulunmuştur. Ampisilin+sulbaktam, sefalotin, sefuroksim ve sulfame

Tablo 1. MİK dağılımı, MİK aralığı, MİK₉₀ ve duyarlılık oranları

Antibiyotikler	Media	0.002	0.004	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024	MİK Aral.	MİK ₉₀ %R	%I	%S
Amplisilin	Broth								1	1	5	8	1										0.25-4	2		100
	İdrar										2	7	5	1		1							2-32	16		
	G idrar										4	3	7				2						2-64	64		
Amplisilin + sulbaktam	Broth							1		1	3	7	4										0.12-4	4		100
	İdrar												5	8	2		3						4-64	64		
	G idrar												4	10			1	1					4-128	64		
Sefalotin	Broth								1		1	1	4	9									0.25-8	8		100
	İdrar										1	1	5	9									2-16	16		
	G idrar											2	6	8									4-16	16		
Sefuroksim	Broth									2	2	4	8										0.5-4	4		100
	İdrar										2	5	3	6									2-16	16		
	G idrar										1	6	5	4									2-16	16		
Seftriakson	Broth		2																				0.004-0.12	0.12		100
	İdrar										1	4											0.03-1	1		
	G idrar										1	4											0.015-2	2		
Amikasin	Broth												6	5	5								4-16	16		100
	İdrar						1			1	3	5	2	1	1	2							0.06-32	32		
	G idrar										6	4	2	2	2								1-16	16		
Siprofloksasin	Broth	3	3	3	2						1						4						0.002-64	64	25	68.8
	İdrar									3							3	1					0.015-128	64		
	G idrar										1						2	2					0.015-128	128		
Sulfametoksazol	Broth															1			3	1		11	32->1024	>1024	75	25
	İdrar																		2	3	1	10	256->1024	>1024		
	G idrar																		2	5	2	7	256->1024	>1024		
Trimetoprim	Broth	1								1	1	1				1			5	5			0.002-512	512	68.7	31.3
	İdrar										1	2		1					11	3			0.06-512	256		
	G idrar											1	1	1	1	1		2	6	2			0.03-512	512		

R: dirençli I: orta dirençli S: duyarlı

toksazol için MİK₉₀ hem idrarda hem G idrarda eşit bulunmuştur. Amikasine karşı G idrarda MİK₉₀, idrar MİK₉₀'a göre iki kez düşük bulunmuştur.

İstatistiksel incelemede MİK değerlerin yükselmesi, siprofloksasin, sulfametoksazol ve trimetoprim dışında broth-idrar karşılaştırılması için anlamlı ($p<0.05$); buyyon-G idrar karşılaştırılması için sulfametoksazol ve trimetoprim dışında anlamlı bulunmuştur. Sonuçlar, idrar-G idrar karşılaştırılması için anlamsız bulunmuştur.

TARTIŞMA

Rutin antibiyotiklere duyarlılık deneyleri hastaların tedavisi için çok önemli bilgiler sağlamaktadır, ancak duyarlılık testlerinin güvenilirlik sınırları vardır çünkü bu testler idrarın veya idrarın içindeki çözölmüş maddelerin etkisini dikkate alamamaktadırlar. Kalsyum ve magnezyum iyonları ve pH gibi besiyerine bağılı faktörlerin, duyarlılık testlerinin sonuçlarını etkilediğı daha önceden gösterilmiştir (5). İn vitro yapılan birçok çalışmada, pH'nın antibiyotiklerin aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştı ancak, idrarda bulunan glukoz, üre ve katyonların etkilerini araştıran çalışmalar az sayıdadır. Kuşkusuz etkileyecek faktörler bunlarla da sınırlı değildir. Bu çalışma, idrar yolu infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan bazı antibiyotiklerin aktivitesi üzerine glukozlu idrarın etkisinin belirlenmesi amacı ile planlanmıştır. Daha önceden yaptığımız bir çalışmada, sefalotin dışında bir çok antibiyotiğın idrardaki aktivitelerinde bir düşüş saptamıştık. Çalışmada MİK'ler mikrodilüsyon yöntemi ile paralel olarak buyyon ve pH'sı 6.4 insan idrarında araştırılmıştır. Farklı üç beta-laktam direnç fenotip grubuna ayrılmış 30 *E.coli* suşunun çeşitli antibiyotiklere karşı MİK'leri araştırılmıştır ve elde edilen insan idrarında MİK₉₀'lar daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışma, bazı antibiyotiklerin etkisinin idrar ortamından etkilendiğini ve standart yöntemlerle elde edilen MİK'lerin, idrar yolu infeksiyonların tedavisinde kullanılan bazı antibiyotiklerin etkisini olduğundan daha fazla gösterebileceğini ortaya koymuştur (3).

Yapılan bir başka çalışmada, normal ve diyabetik fare modelinde *Serratia marcescens* kökenine karşı kinolonların etkisi araştırılmıştır. Normal ve diyabetik farelerin serum ve böbrek antibiyotik konsantrasyonların arasında herhangi bir fark görülmemiştir. Bu bulgular, kinolonların diyabetlilerin idrar yolu infeksiyonları tedavisinde etkili ilaçlar olduğunu göstermiştir (6).

Minuth ve ark. (7) yaptıkları çalışmada, idrar ortamındaki gentamisin *E.coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı antibakteriyel etkisini araştırmışlardır. Çalışmada normal idrar kullanılmıştır ve sonuçta, idrarın asidite, osmolarite ve normal komponentlerine bağılı olarak antibiyotik üzerine inhibitör bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. *E.coli* ve *P.aeruginosa* kökenlerin inhibisyonu için idrar ortamında 40 kez daha fazla gentamisine ihtiyaç duyulmuştur. Bu bulgular, özellikle böbrek yetmezliğine bağılı düşük atılım ya da düşük doz kullanımına bağılı idrarda gentamisin düşük konsantrasyonda bulunması durumlarında dikkate alınması gerektiğı bildirilmiştir.

Fromtling ve ark. (8), in vitro olarak idrar ortamında, pH ve glukozun, norfloksasinin antibakteriyel aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, norfloksasinin idrarın pH 6.0, 7.0 ve 8.0 değerlerinde gram-negatif patojenleri etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Glukozun 200 mg/dl ve 400 mg/dl (diyabet glikozürisini taklit ederek) konsantrasyonlarında, *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* ve *P.aeruginosa* suşlarına karşı, norfloksasinin antibakteriyel etkisinin anlamlı bir şekilde değıştirmediğini göstermişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada, sukroz ve glukozun 30 *Streptococcus* mutans suşuna karşı sefalosporinin aktivitesinin ne şekilde etkilendiğini araştırılmıştır. Suşların yaklaşık %21'i sukroz varlığında duyarlı, glukoz varlığında ise dirençli saptanmıştır. Dört farklı sefalosporine karşı sukroz MİK değerleri glukoz MİK değerlerine göre daha düşük bulunmuştur. Araştırmacılar, bu bulguları sukroz varlığında çözölemeyen glukanın sentezi ile

açıklamaktadırlar. Glukanın sentezi, bakteriler arasındaki mesafeyi ve aynı zamanda antibiyotiğin diffüzyonunu artırmaktadır (9).

Bu çalışmada, araştırılan antibiyotiklerin antibakteriyal aktivitesi üzerine glukozun büyük bir etkisi saptanamamıştır. Antibiyotiklerin *in vitro* aktiviteleri insan idrarında ve glukozlu insan idrarında benzer bulunmuştur ancak MİK değerleri, hem insan idrarında hem de şekerli insan idrarında broth ortamına göre daha yüksek bulunmuştur. Bu antibiyotiklerin MİK'lerinin insan idrarının içeriğinden etkilendiği ve idrar yolu infeksiyonlarının tedavisinde bu bulguların dikkate alınması gerekmektedir. Bu çalışma ile birlikte birkez daha standart test yöntemi ile elde edilen sonuçların, idrar gibi daha karmaşık *in vivo* koşullarda elde edilen sonuçlardan daha farklı olabileceği vurgulanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Caron F. Bases pharmacologiques de l'antibiothérapie des infections urinaires (1re partie): données expérimentales *in vitro*. Antibiotiques 1999; 1: 27-31.
2. Hoepelman AIM, Meiland R, Geerlings SE. Pathogenesis and management of bacterial urinary tract infections in adult patients with diabetes mellitus. Int J Antimicrob Agents 2003; 22: 35-43.
3. Büyükbaba-Boral Ö, Gönüllü N, Küçükbasmacı Ö, Anđ-Küçüker M, Anđ Ö. The influence of urine on the *in vitro* antimicrobial activity of various antibiotics against different *Escherichia coli* phenotypes. Chemotherapy 2004; 50: 35-39.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, ed 5. Approved Standard M7-A5. Wayne, Pa USA: NCCL, 2000.
5. Nicolle LE. Measurement and significance of antibiotic activity in the urine. In: Lorian V, ed. Antibiotics in Laboratory Medicine, 4. baskı Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1996: 793-812.
6. Obana Y, Nishino T. Therapeutic efficacy of ofloxacin, ciprofloxacin and NY-198 in experimentally infected normal and alloxan-induced diabetic mice. Drug Exp Clin Res 1988; 14: 327-331.
7. Minuth JN, Musher DM, Thorsteinsson SB. Inhibition of the antibacterial activity of gentamicin by urine. J Infect Dis 1976; 133: 14-21.
8. Fromtling RA, Abruzzo GK, Gadebush HH. *In vitro* effect of pH and glucose concentration on the antibacterial activity of norfloxacin in urine. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1984; 6: 737-741.
9. Petti S, Renzini G, Tarsitani G. Effect of sucrose and glucose on the susceptibility of *Streptococcus mutans* to cephalosporins. New Microbiol 1998; 21: 289-293.