

# İnsan Makrofajları İçindeki Salmonella Typhi Üzerine Ampisilin, Siprofloksasin Ve Ofloksasin'in Etkileri (\*)

Bora EKİNCİ (\*\*), Belma DURUPINAR (\*\*)

## ÖZET

Enterik ateş gelişmekte olan birçok ülkede hala ciddi bir sağlık sorunudur. Diğer hücre içi patojenlerin neden olduğu infeksiyonlardaki gibi, Salmonella türlerinin fagositer hücrelerde gelişimi önemli bir patojenite kriteridir. Konak hücreye girerek, fagolizozomlarda gelişebilirler ve antibakteriyel ajanların etkisinden kurtulurlar, dolayısıyla antibiyotiklerin in-vivo etkileri, in-vitro etkinlikleri gibi iyi değildir.

Bu çalışmada ampisilin, siprofloksasin ve ofloksasin'in insan monosit kökenli makrofajları içindeki iki Salmonella typhi suşu (klinik ve standart) üzerine etkinliği incelendi. İnsan monosit kökenli makrofajlar, 10 bakteriye bir makrofaj olacak şekilde S. typhi suşları ile infekte edildi. Antibiyotikler MYK ve 10 X MYK değerlerinde ortama eklendi. Örnekler hem kültür yöntemi, hemde direk olarak canlı ve ölü bakterileri görmemize olanak sağlayan LIVE/DEAD BacLight boyama yöntemi ile incelendi. MYK değerinde hücre içi en az etkin ajan ampisilin ve 10 X MYK değerinde ise her üç antibiyotik de iyi aktiviteye sahip olduğu bulundu. Örnekler kültür yöntemi ile saptanamayan canlı bakterilerin gözlenmesine olanak sağlayan BacLight boyama yöntemi ile de değerlendirildi. Her üç antibiyotik hücre içi S. typhi üzerinde 10 X MYK değerinde iyi etkinliği sahipken ampisilin'in MYK değerinde etkinliğinin iyi olmadığı saptandı.

Anahtar Kelimeler: Makrofaj, Salmonella typhi, BacLight boyama yöntemi, Kinolonlar.

## SUMMARY

In Vitro Effects Of Ampicillin, Ciprofloxacin And Ofloxacin On Salmonella Typhi Within Human Monocyte-Derived Macrophages

Enteric fever is still a serious health problem in most developing countries. Like other infections caused by intracellular pathogens, growing ability of Salmonella species in phagocytes is an important pathogenicity criteria. By entering host cell, they grow in phagolysosomes and are protected from effects of antibacterial agents, thus the effectiveness of antibiotics can not be good in-vitro as in-vivo.

In this study, we examined the killing effects of ampicillin, ciprofloxacin and ofloxacin to two Salmonella typhi strains (clinical and a standard), within human monocyte-derived macrophages. Human monocyte derived macrophages were infected by two S. typhi strains at a cell ratio of 10 bacteria per one macrophage (10:1). Antibiotics were added at MIC and 10 X MIC. Specimens were examined by both culture and LIVE/DEAD BacLight staining system which allow us to see dead and live bacteria directly. At MIC the least potent intracellular agent was ampicillin and at 10 X MIC all three had good activity. When specimens were estimated by using BacLight staining system, made possible us to see directly live bacteria, which could not be detected by culture method. All three antibiotics had good effects on intracellular S. typhi at 10 X MIC, whereas ampicillin had not at MIC.

Key words: Macrophage, Salmonella typhi, BacLight staining system, Quinolones.

## GİRİŞ

Enterik ateş günümüzde, birçok ülkede mortalite ve morbidite ile ilişkili sağlık sorunu olarak önemini

sürdürmektedir (1). Salmonellalar'ın etken olduğu infeksiyonun patogeneğinde bakterinin barsak mukozasını geçerek makrofajlar içerisinde de yaşamını sürdürmesi önemlidir (2). Dolayısıyla konak savunmasında konak hücreye invaze olan Salmonella'ların fagositik hücrelerce fagosite edilmesi önem kazanır. Salmonella türlerinin hücre içine girdikten sonra konak hücrenin fagolizozomlarında üreyebilme özel-

(\*) Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakterioloji ve İnfeksiyon Hastalıkları AD

(\*\*) İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji AD

likleri gösterilmiştir (3,4).

Salmonella infeksiyonu tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin ortam şartlarına dayanıklılıklarının yanı sıra hücre içerisinde yeterli ve etkin konsantrasyona ulaşmaları önemlidir. Salmonella türlerinin hücre içinde üremeleri sonucu hücre içi daha asidik ve daha viskoz hale gelir ve bu durum antibiyotiklerin etkinliğinin azalmasına neden olur (1). S.typhi'nin neden olduğu enterik ateş ve taşıyıcıların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin in vitro etkinliklerinin iyi olmasına karşın in vivo etkileri beklendiği kadar iyi değildir (1,5).

Çalışmada ampisilin (amp), siprofloksasin (cip) ve ofloksasin (ofx)'in in vitro insan monosit kökenli makrofajlar tarafından fagosite edilmiş S.typhi suşlarına etkileri, kültür yöntemi yanısıra bakteri popülasyonunda canlı ve ölü bakterilerin görsel olarak ayırımını sağlayan BacLight™ boyama yöntemi ile de araştırılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Suşlar: S.typhi-42 TA (2-1) standart suşu, Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü'nden, klinik izolat, O.M.Ü. Tıp Fakültesi, Merkez Lab., Bakteriyojoloji Ünitesi'ne gelen gaita örneklerinden elde edildi. Suşlar kullanılmaya kadar %20 gliserollü Brain-Heart Infusion (BHI) besiyerinde (Difco) saklandı. Bakteri sayısı yumuşak agar kat yöntemiyle nutrient agarda saptandı. Çalışmada mililitrede  $1 \times 10^6$  koloni oluşturan bakteri (kob) kullanıldı.

**İnsan Monosit Kökenli Makrofajlar:** İnsan monosit kökenli makrofajlar; HIV, Hepatit ve herhangi bir infeksiyon hikayesi olmayan kişilerin periferik kanlarından Ficoll-Hypaque density gradient yöntemi ile elde edildi (1,6). RPMI 1640 + %10 Fetal Calf Serum (FCS)'u (Sigma) içeren hücre kültür kaplarında (Greiner), 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li nemli ortamda 7-12 gün inkübe edildi. 3 günde bir besiyeri değiştirildi (1,2,5,7).

**Antibiyotiklerin Minimum İnhibitör Konsantrasyonları (MYK) Değerlerinin Saptanması:** Çalışmada amp "Mustafa Nevzat Ylaç San.", cip "Bayer

Türk Kimya", ofx "Hoechst Marion Roussel", ve Gentamisin (gen) "Bilim Ylaç San." firmalarından sağlandı. Uygun çözücülerde ( amp, pH 8.0 Fosfat tuz tampon solusyonu (PBS); ofx ve gen distile su; cip, 0.1 N NaOH ) çözüldü (8). MYK değerleri katyon eklenmiş Mueller Hinton besiyerinde (MHB) (Difco) makrodilüsyon yöntemiyle saptandı (8,9).

**Makrofajların Ynfekte Edilmesi:** Makrofajlar buz soğukluğundaki %0.02 EDTA/PBS'te 10 dakika bekletildikten sonra hücre kazıyıcısı yardımı ile kültür şişelerinden (Costar) ayrıldı (6).

Makrofajlar, S.typhi ile infekte edilmeden 1 gece önce 96 kuyucuklu plaklara (Greiner), 104 hücre/kuyucuk olacak şekilde eklendi. 1 gece 37°C'de, %5'lik CO<sub>2</sub>'li nemli inkübatörde inkübe edildi. S.typhi suşları %10 insan serumu içeren ortamda 37°C'de 30 dakika opsonize edildi. Makrofajların bulunduğu ortamdaki besiyeri değiştirildikten sonra her kuyucuğa makrofaj/bakteri 1:10 olacak şekilde S.typhi suşları (105 bakteri/kuyucuk) eklendi. Plak 200 rpm'de 5 dk rotatorda homojen yayılım için çevrildikten sonra, fagositoz için 37°C'de, %5'lik CO<sub>2</sub>'li nemli ortamda 30 dak. inkübe edildi. Kuyucuklar fagosite olmayan bakterilerin uzaklaştırılması için PBS ile yıkandı(1,7,10,11,12). Antibiyotikler kontrol kuyucukları dışındaki kuyucuklara MYK ve MYK'in 10 katı değerlerinde eklendi. Hücre dışı bakterilerin öldürülmesi amacı ile 10 g/ml gentamisin eklendi (1,11).

**Örneklerin Alınması:** Örnekler 0, 3, 6 ve 24. saatlerde alındı. Besiyerleri uzaklaştırılarak %0.5'lik sodyum deoksikolat eklendi (Sigma) (4,7,10). Daha sonra kuyucuklardaki örnekler toplandı. 100 l'si yumuşak agar kat yöntemi ile nutrient agara ekildi ve üremeler değerlendirildi (13). BacLight boyama işlemi için geri kalan örnek solusyonları, 10000 X g'de 5 dak santrifuj edilerek besiyeri uzaklaştırıldı. Pellet 0.22 m porlu membran filtreden filtre edilmiş deiyonize steril suda suspansiyon edildi. Suspansiyon 1ml bakteri suspansiyonu / 3l BacLight boya karışımı ile karıştırılarak 15 dk oda ısısında, karanlık ortamda inkübe edildi ve "NIKON" floresan mikroskopta incelendi.

Çalışmada ayrıca MYK ve 10 X MYK değerlerinde

ki amp, cip ve ofx'in makrofajsız ortamda S.typhi üzerine direkt etkileri de araştırıldı.

### LIVE/DEAD BacLight Boyama Yöntemi

LIVE/DEAD BacLight boyama kiti "Molecular Probes Inc., Oregon A.B.D." firmasından sağlandı.

Sonuçlar kültür yanısıra canlı ve ölü bakterilerin direkt olarak ayırımını sağlayan LIVE/DEAD BacLight boyası ile boyanarak da değerlendirildi. BacLight boyası, kırmızı floresan veren, ölü bakterilerin ayırımını sağlayan propidyum iodid ve yeşil floresan veren, canlı bakterilerin ayırımını sağlayan SYTO 9 boyalarından oluşan bir boyadır. Bakterilerin boyanması hücre membranları ile ilişkilidir. Hücre zarı zarar görmüş ölü bakteriler propidyum iodid ile boyanarak kırmızı, canlı bakteriler ise SYTO 9 ile boyanmaları nedeniyle yeşil renkte gözlenirler.

### BULGULAR

Çalışmada aynı alanda mevcut canlı ve ölü bakteriler BacLight boyası ile boyanarak saptanmıştır (Resim 1 ve 2). Amp, cip ve ofx'in standart ve klinik suşlar için saptanan MYK değerleri Tablo I'de sunulmuştur. Amp, cip ve ofx'in makrofaj içeren ve içermeyen ortamlarda, MYK ve 10 X MYK değerlerinde standart ve klinik suşlara etkileri kültür sonuçları esas alınarak değerlendirilmiştir (şekil 1-8). Antibiyotikler makrofajsız ortamda ve MYK değerlerinde standart suşa benzer etki gösterirken klinik suşta amp'in etkisi cip ve ofx'den daha düşük ( $p<0.05$ ) olmuştur. Amp, cip ve ofx 10 X MYK değerlerinde ise, standart ve klinik suş üzerinde benzer etki göstermişlerdir (şekil 1-4).

Çalışmada makrofajların trypan mavisi ile canlılıkları %90 olarak saptanmıştır.

Amp, cip ve ofx'in makrofaj içeren ortamda MYK ve 10 X MYK değerlerinde standart ve klinik suşlara etkileri şekil 5-8' de sunulmuştur.

Amp, cip ve ofx makrofaj içeren ortamda MYK ve 10 X MYK değerlerinde standart suş üzerinde aynı etkiyi göstermişlerdir (şekil 5 ve 6). Klinik suşta, MYK değerinde ofx daha fazla etkili, standart suşa ise amp daha az etkili olmuş ancak bu fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ) (şekil 7 ve 8).

Çalışmada makrofaj içeren ve içermeyen ortamlarda antibiyotiklerin etkileri BacLight boyama yöntemiyle de değerlendirilmiş ve sonuçlar kültür ile uyumlu bulunmuştur (Tablo 2 ve 3). Ancak, kültürde üreme gözlenmemesine karşı, BacLight boyası ile canlı olarak saptanan bakterilerin varlığı dikkati çekmiştir. Özellikle MYK değerlerinde canlı olarak saptanan bu bakterilerin antibiyotiklerin etkisi azaldıktan sonra sayıca arttıkları gözlenmiştir. BacLight boyama yönteminin özellikle kob sayısını düşük olduğu durumlarda canlı bakterilerin saptanmasına olanak verdiği görülmüştür.

### TARTIŞMA

Hücre içi patojeni olan S.typhi'nin neden olduğu ti-

Tablo1. Amp, cip ve ofx'in MYK değerleri

Antibiyotik	MYK (g/ml.)	
	Klinik Suş	Standart Suş
Ampisilin	1.0	1.0
Siprofloksasin	0.06	0.0075
Ofloksasin	0.250	0.06

Tablo 2. MIK değerlerindeki antibiyotiklerin etkisinin BacLight boyama ve kültür yöntemleri ile değerlendirilmesi

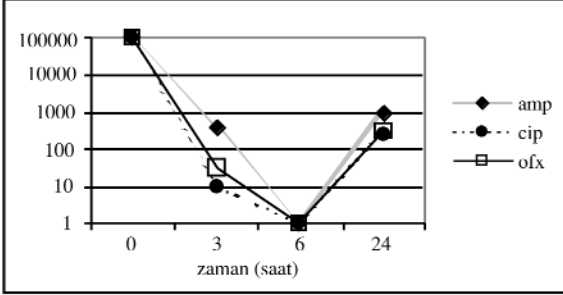
Saat	KLİNİK SUŞ												STANDART SUŞ											
	Hücre İçi						Hücre Dışı						Hücre İçi						Hücre Dışı					
	Boya (Ö/C)			Kültür (n)			Boya (Ö/C)			Kültür (n)			Boya (Ö/C)			Kültür (n)			Boya (Ö/C)			Kültür (n)		
	Amp	Cip	Ofx	Amp	Cip	Ofx	Amp	Cip	Ofx	Amp	Cip	Ofx	Amp	Cip	Ofx	Amp	Cip	Ofx	Amp	Cip	Ofx	Amp	Cip	Ofx
0	0/6	1/5	1/7	1x104	1x104	1x104	*	*	*	1x105	1x105	1x105	0/6	1/6	1/6	1x104	1x104	1x104	*	*	*	1x105	1x105	1x105
3	0/4	1/2	0/2	200	30	20	3/4	0/1	0/1	1x104	50	20	1/4	1/3	1/4	100	20	20	2/3	2/1	5/2	380	10	30
6	1/2	2/5	1/3	0	10	0	5/3	0/1	1/2	2x103	0	10	0/3	0/2	1/1	100	0	0	1/1	2/1	3/1	0	0	0
24	1/3	0/2	0/1	300	400	10	21/10	15/4	4/5	1x104	600	800	1/4	0/2	0/2	300	90	90	16/12	10/5	10/3	1x103	250	300

Ö: Ölü; C: Canlı; n: kob/ml; \*: Tamamı canlı saptananlar

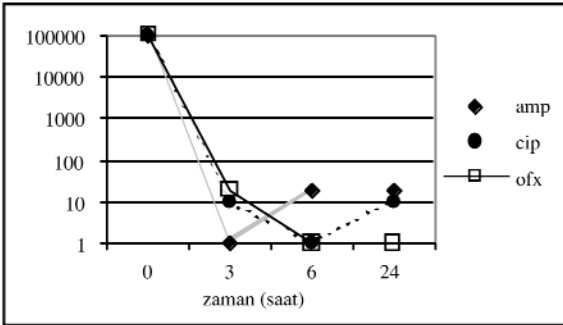
fo birçok ülkede sorun olmayı sürdürmektedir. S.typhi'nin konağa girdikten sonra yayılarak infeksi-

yon oluşturabilmesi için öncelikle makrofajlara invaze olup, makrofajların bakterisidal etkilerinden korunması gerekmektedir (14).

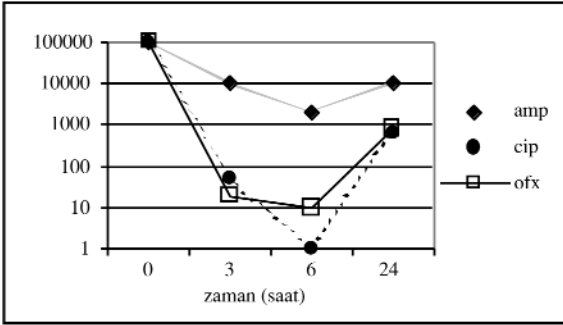
Şekil 1. Makrofaj içermeyen ortamda amp, cip ve ofx'in MYK değerlerinde standart suşa etkileri



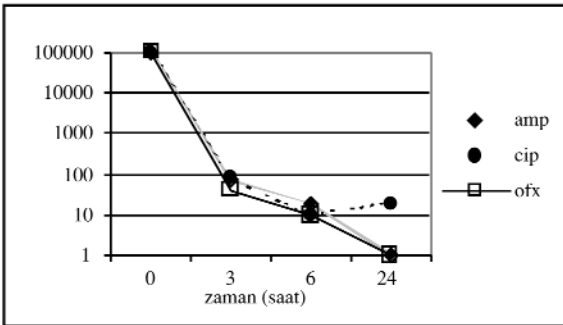
Şekil 2. Makrofaj içermeyen ortamda amp, cip ve ofx'in 10x MYK değerlerinde standart suşa etkileri



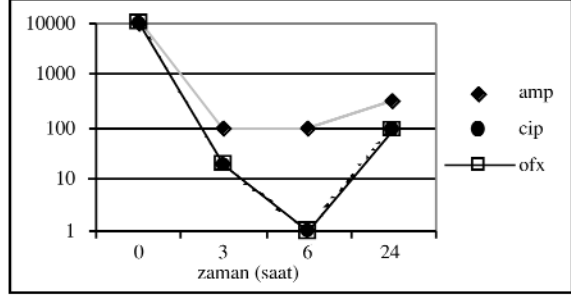
Şekil 3. Makrofaj içermeyen ortamda amp, cip ve ofx'in MYK değerlerinde klinik suşa etkileri



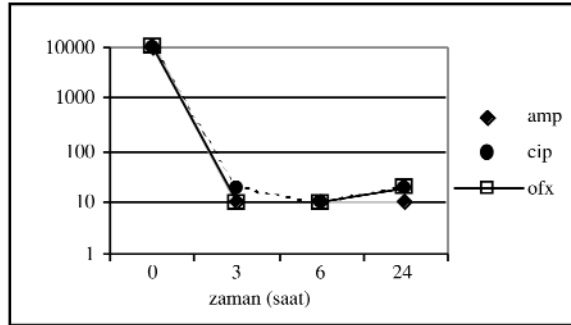
Şekil 4. Makrofaj içermeyen ortamda amp, cip ve ofx'in 10x MYK değerlerinde klinik suşa etkileri



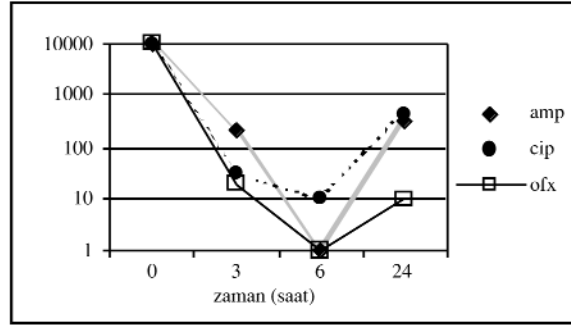
Şekil 5. Makrofaj içeren ortamda amp, cip ve ofx'in MYK değerlerinde standart suşa etkileri



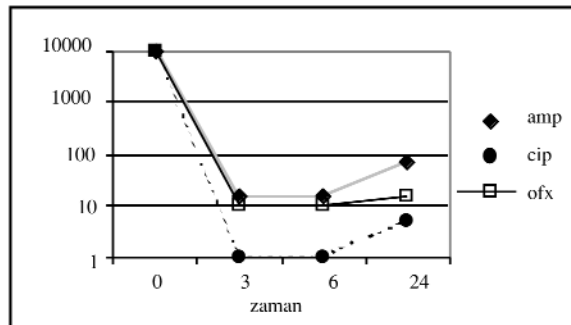
Şekil 6. Makrofaj içeren ortamda amp, cip ve ofx'in 10X MYK değerlerinde standart suşa etkileri



Şekil 7: Makrofaj içeren ortamda amp, cip ve ofx'in MYK değerlerinde klinik suşa etkileri



Şekil 8: Makrofaj içeren ortamda amp, cip ve ofx'in 10X MYK değerlerinde klinik suşa etkileri



Hücre içi infeksiyon oluşturan böyle bir patojenin tedavisinde, hücre içinde oldukça aktif ve hücre içi penetrasyonu iyi olan ilaçların kullanımı yanısıra antibiyotik direnç sorunu önemli olmaktadır. Özellikle Hindistan, Pakistan, Vietnam gibi ülkelerde direnç problemi oldukça sık karşılaşılan bir sorundur (15,16). S.typhi infeksiyonu tedavisinde hücre içine iyi penetre olabilen amp, kloramfenikol ve trimetoprim-sulfametaksazol (tmt-sxt) öteden beri kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda bu antibiyotiklere karşı direnç gelişmesi, yeni ilaç arayışlarını başlatmış, yeni kinolonlar ve 3. kuşak sefalosporinler tedavide kullanılmış ve başarılı olmuşlardır (15,16,17).

Çalışmada S.typhi infeksiyonlarında günümüze kadar kullanılmakta olan amp yanısıra kinolon grubundan cip ve ofx'in hücre içi ve hücre dışı etkinlikleri makrofaj içeren ve içermeyen ortamlarda çalışılarak araştırılmıştır.

Çalışmada MYK değerlerindeki amp'in özellikle makrofajsız ortamdaki bakterilere etkisi cip ve ofx'ten düşük ( $p<0.05$ ), makrofajlı ortamda ise ofx daha etkili bulunmuştur. 10 X MYK değerlerinde ise aralarında fark saptanmamıştır. Antibiyotiklerin maksimum etkisi MYK değerlerinde 6., 10 X MYK değerlerinde ise 3. saatte gözlenmiştir. Sonuçlarımız Van Den Broek ve ark. (18)'nyn Staphylococcus aureus ile yaptıkları çalışma ile uyumludur (18).

Kinolon grubu antibiyotik olan ofx ve cip, MYK değerlerinde 3. saatten itibaren hücre içi ve hücre dışı bakterilerin üremelerini inhibe etmişler, 6. saatte maksimum etkilerini göstermişlerdir ( $p<0.001$ ). 10 X MYK değerlerinde ise maksimum etkinliğe 3. saatte ulaşılmıştır. Ofx ve cip'in hücre içi ve hücre dışı etkinlikleri arasında anlamlı fark saptanmamış ancak ofx'in hücre içi etkinliğinin cip'den daha yüksek olduğu görülmüştür.

Une T ve Osada Y (19), ofx, norfloksasin ve cip'in hücre içi birikimlerini epitelyal hücrelerde ve makrofajlarda karşılaştırmışlar ve ofx'in diğer antibiyotiklere oranla hücre içine penetrasyonunun daha iyi olduğunu gözlemişlerdir (19). Pascual ve ark. (20)'da

benzer şekilde kinolonların hücre içi penetrasyonlarının iyi olduğunu saptamışlardır (20).

Antibiyotiklerin hücre içi ve hücre dışı etkileri konsantrasyonlarına bağlı olarak farklı olmuştur. 24.saat sonunda MYK değerlerinde hücre içi etkinlikleri fazla ( $p<0.05$ ), 10 X MYK değerlerinde ise hücre içi ve hücre dışı etkinlikleri benzer bulunmuştur.

S. aureus ile yapılan bir çalışmada amp yanında bir grup antibiyotiğin hücre içi etkinlikleri araştırılmış ve MYK değerlerinde antibiyotiklerin etkileri daha az olarak saptanmıştır (21). Bizim çalışmamızda da antibiyotiklerin özellikle 24. saat sonundaki etkilerine bakıldığında MYK değerlerindeki etkilerinin 10 X MYK'e oranla daha az olduğu gözlenmiştir.

Amp, Cip ve Ofx'in makrofajlar içerisindeki bakterilere etkilerinin kesin olarak saptanabilmesi için benzer çalışmaların, in vivo hayvan deneyleri ile desteklenmesi ve sonuçların bir arada değerlendirilmesi yararlı olacaktır.

Çalışmada BacLight boyası ile canlı olarak gözlenen ancak kültürde üreme oranları düşük olan veya üreme gözlenmeyen bakteriler de saptanmıştır (Tablo 2,3). Antibiyotik etkisi ile üreme yeteneklerini kaybeden bu bakterilerin membran yapıları bozulmamış olan canlı bakteriler olduğu sonucuna varılmıştır. Antibiyotiklerin hücre içi etkinliklerinin araştırılmasında canlı ve ölü bakterilerin bir arada bulunmaları nedeniyle kültür sonuçlarının tek başına yeterli olmadığı ve BacLight boyama yöntemi gibi bir tekniğin kullanımının uygun olacağı görülmüştür.

## KAYNAKLAR

- 1.Chang HR, Vladoianu IR, Pechere JC:** Effects of Ampicillin, Ceftriaxone, Pefloxacin, and Trimethoprim-Sulfamethoxazole on Salmonella typhi within Human Monocyte-Derived Macrophages, J Antimicrob Chemother 26:689 (1990).
- 2.Sizemore DR, Elsinghorst EA, Eck LC, Branstorm AA, Hoover DL, Warren RL, Rubin FA:** Interaction of Sallmonella typhi Strains with Cultured Human Monocyte-Derived Macrophages, Infec Immun 65(1):309 (1997).
- 3.Arias M, Rojas M, Zabaleta J, Rodriguez JI, Paris SC, Barrera LF, Garcia LF:** Inhibition of Virulent Mycobacterium tuberculosis by Bcgr and Bcgs Macrophages Correlates with Nitric Oxide Production. J Infect Dis, 176:1552 (1997).

- 4. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F:** Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent, *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5189 (1986).
- 5. Balland O, Pinto-Alphandry H, Viron A, Puvion E, Andreumont A, Couvreur P:** Intracellular Distribution of Ampicillin in Murine Macrophages Infected with *Salmonella typhimurium* and Treated with (3H)ampicillin-Loaded Nanoparticles, *J Antimicrob Chemother* 37:105 (1996).
- 6. Coligan JE, Kruisbeek AM, Morgulies DH, Schevach EM, Strober:** *Current Protocols in Immunology*, sect 7.0-7.5, W. John Wiley & Sons Inc., USA (1994).
- 7. Buchmeier NA, Heffron F:** Intracellular Survival of Wild-Type *Salmonella typhimurium* and Macrophage-Sensitive Mutants in Diverse Populations of Macrophages, *Infect Immun* 57(1):1 (1989).
- 8. Isenberg HD:** *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology. Washington D.C. (1992).
- 9. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC:** *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, pp171-251, 5th Ed, Lippincott, Philadelphia (1997).
- 10. Buchmeier NA, Libby SJ:** Dynamics of growth and death within a *Salmonella typhimurium* and population during infection of macrophages, *Can J Microb* 43:29 (1997).
- 11. Oh YK, Aranda CA, Berthiaume E, Jinks T, Miller SI, Swanson JA:** Rapid and Complete Fusion of Macrophage Lysosomes with Phagosomes Containing *Salmonella typhimurium*, *Infect Immun* 64(9):3877 (1996).
- 12. Shiloh MU, Ruan J, Nathan C:** Evaluation of Bacterial Survival and Phagocyte Function with a Fluorescence-Based Microplate Assay, *Infect Immun* 65(8):3193 (1997).
- 13. Bilgehan H:** *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, 2. Baskı, s.133 Baryş Yayınları, İzmir (1995).
- 14. Buchmeier NA, Heffron F:** Induction of *Salmonella* Stress Proteins upon Infection of Macrophages, *Science* 248:730 (1990).
- 15. Bhat KG, Andrade AT, Kardesai SG, Hemashethar BM, Patil CS:** Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella typhi* to Quinolones & Cephalosporins, *Indian J Med Res* 107:247 (1998).
- 16. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M:** *İnfeksiyon Hastalıkları*, s.491, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul (1996).
- 17. Ünal S, Hayran M, Tuncer S, Gür D, Uzun Ö, Akova M, Akalyn HE:** Treatment of Enteric Fever with Pefloxacin for 7 Days versus 5 Days: Randomized Clinical Trial, *Antimicrob Agents Chemother* 40(12):2898 (1996).
- 18. Van Den Broek PJ, Buys LFM, Van Den Barselaar MT, Leyjh PCJ, Van Furth R:** Influence of Human Monocytes on the Antibacterial Activity of Kanamycin and Gentamicin for *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother* 29(6):1032 (1986).
- 19. Une T, Osada Y:** Penetrability of Ofloxacin into Cultured Epithelial Cells and Macrophages. *Arzneimittelforschung*, (Abstracts) 38(9):1265 (1988).
- 20. Pascual A, Garcia I, Perea EJ:** Entry of Lomefloxacin and Temafloxacin into Human Neutrophils, Peritoneal Macrophages, and Tissue Culture Cells, *Diag Microb Infect Dis* 15(5):393 (1992).
- 21. Vosbeck K, James PR, Zimmermann W:** Antibiotic Action on Phagocytosed Bacteria Measured by a New Method for Determining Viable Bacteria, *Antimicrob Agents Chemother* 25(6):735 (1984).