



# Exogen cihazı kaynaklı düşük yoğunluklu ses dalgalarının *Staphylococcus aureus* morfolojisi ve genetiği üzerine etkileri

## *The effect of low-intensity pulsed sound waves delivered by the Exogen device on Staphylococcus aureus morphology and genetics*

İrfan AYAN,<sup>1</sup> Gönül ASLAN,<sup>2</sup> Ülkü ÇÖMELEKOĞLU,<sup>3</sup> Nejat YILMAZ,<sup>4</sup> Mehmet ÇOLAK<sup>1</sup>

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, <sup>3</sup>Biyofizik Anabilim Dalı, <sup>4</sup>Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**Amaç:** Bu çalışmada ortopedik cerrahide kaynama gecikmesi ya da kaynamama durumlarında kullanılması önerilen Exogen cihazı ile verilen düşük yoğunluklu ses dalgalarının, ortopedik enfeksiyonlarda sık karşılaşılan *Staphylococcus aureus*'un koloni sayısı, antimikrobiyal duyarlılığı, bakteriyel morfolojisi ve genetiği üzerine etkisi araştırıldı.

**Çalışma planı:** İçinde *S. aureus* (ATCC 25923) suşu bulunan 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan 30 adet tüp süspansiyonunun 15'ine (test grubu) 20 dakika boyunca Exogen cihazı ile düşük yoğunluklu ses dalgası uygulanırken, diğer 15'ine (kontrol grubu) ses dalgası uygulanmadı. Uygulama sonrasında iki gruptaki tüpler koloni sayısı, antibiyotik duyarlılığı ve genotip farklılıklar açısından karşılaştırıldı. Grupların histolojik değerlendirmeleri elektron mikroskopu ile yapıldı.

**Sonuçlar:** Uygulama sonrasında, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, test grubundaki bakteri koloni sayısı anlamlı derecede azalmış bulundu ( $p<0.001$ ). İki grup arasında antibiyotik duyarlılığı ve genotip değişim açısından anlamlı fark bulunmadı. Kontrol grubundaki bakterilerin hücre duvar yapıları normal bulunurken, test grubunda hücre duvarlarında kısmi yıkım veya parçalanma görüldü. Bakteri hücre duvar kalınlığı test grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazla idi (sırasıyla, 41.54 nm ve 24.27 nm,  $p<0.001$ ).

**Çıkarımlar:** Düşük yoğunluklu ses dalgasının, ortopedik cerrahide enfeksiyonun önlenmesi için profilaktik olarak ya da enfekte kaynamamaların tedavisinde adjuvan bir yöntem olarak kullanılması düşünülebilir.

**Anahtar sözcükler:** Bakteri/analiz/genetik; koloni sayımı, mikrobiyal; *Staphylococcus aureus*; ultrasonik tedavi.

**Objectives:** We investigated the effect of low-intensity pulsed sound waves delivered by the Exogen device, which is recommended for the treatment of delayed union and nonunion in orthopedic surgery, on the colony number, antimicrobial susceptibility, bacterial morphology, and genetics of *Staphylococcus aureus*, which is a frequent pathogen in orthopedic infections.

**Methods:** Thirty tubes containing 0.5 McFarland suspensions of *S. aureus* (ATCC 25923) were used. Fifteen tubes forming the test group were subjected to low-intensity sound waves by the Exogen device for 20 minutes. The remaining 15 tubes were untreated as controls. The two groups were then compared with respect to colony number, antibiotic susceptibility, and genotypic properties. The tubes were examined histologically by electron microscopy.

**Results:** The test tubes treated with sound waves showed a significantly lower number of bacteria colonies compared to the control tubes ( $p<0.001$ ). The two groups were similar with respect to antibiotic susceptibility and genotypic properties. Bacterial cell wall structure in the control group was of normal appearance, whereas partial destruction and break-up were observed in test samples. Bacterial cell wall thickness was significantly higher in the test group compared to the control group (41.54 nm and 24.27 nm, respectively;  $p<0.001$ ).

**Conclusion:** Low-intensity sound waves may be beneficial as a prophylactic measure to prevent infections in primary orthopedic operations and as an adjuvant therapy for infected nonunions.

**Key words:** Bacteria/analysis/genetics; colony count, microbial; *Staphylococcus aureus*; ultrasonic therapy.

Ses dalgalarının mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkilerine ilişkin araştırmalar 1920'lerde başlamıştır.<sup>[1]</sup> Yiyecek sektöründe, cerrahi aletlerin sterilizasyonunda, atık suların dezenfeksiyonunda, medikal cihazların üzerinde oluşan biyofilm tabakasının yok edilmesinde ve böylelikle antibiyotik etkisinin artırılmasında ses dalgaları kullanılmaktadır.<sup>[2-4]</sup> Ultrasonografi uygulaması sırasında oluşan ses dalgaları, mikroorganizmalar üzerinde tekrarlayan baskı ve genişleme gibi fiziksel etkilerle hücre duvarlarında yıkıma, lokal ısınmaya ve serbest radikallerin oluşmasına yol açmaktadır. Ses dalgalarının bu yararlı etkilerinin yanı sıra, insan ve hayvanların sağlıklı dokularında genotoksik etkileri de gösterilmiştir.<sup>[5-9]</sup> Ancak, ilgili yayınlar araştırıldığında, *Staphylococcus aureus* üzerine bildirilen herhangi bir genotoksik etkiye rastlanmamıştır.

Bu çalışmada Exogen cihazı kaynaklı düşük yoğunluklu ses dalgası uygulanan *S. aureus* kolonilerinde morfolojik yapı, koloni sayısı, genetik yapı ve antibiyotik duyarlılığında değişiklik olup olmadığı, mikrobiyolojik ve histolojik yöntemler kullanılarak araştırıldı.

## Gereç ve yöntem

Hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında hazırlanan *S. aureus* suşu içerikli 30 adet tüp, test grubu (n=15) ve kontrol grubu (n=15) olmak üzere ikiye ayrıldı. Test grubuna Exogen cihazı aracılığıyla düşük yoğunluklu ses dalgası uygulanırken, kontrol grubu bu uygulamaya dahil edilmedi. Uygulama sırasındaki ısı değişimleri termoçift ile kaydedildi.<sup>[10]</sup> Ses dalgası uygulamasından sonra bakteri süspansiyonları, bakteri ince yapısının değerlendirilmesi amacıyla histoloji laboratuvarına yollandı. Uygulama sonrasında iki grup bakteri koloni sayısı, antibiyotik duyarlılığı, genotip ve histolojik ölçüm sonuçları bakımından karşılaştırıldı.

## Bakterinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan *S. aureus* (ATCC 25923) suşu, triptik soya besiyerinde (BBL) 37 °C'de 16-18 saat arası inkübe edildikten sonra kanlı agar besiyerine pasajlandı. Üreyen bakterilerin saflık kontrolü yapılarak, triptik soya besiyerinde 0.5 McFarland süspansiyonları hazırlandı ve ağzı kapalı cam tüplere 0.5 ml aktarıldı. Bu prosedür Exogen cihazımızın üç tane olması nedeniyle, bir seferinde üçer test ve kontrol işlemi için toplam 30 tüp oluncaya kadar tekrar-

lanarak örnekler aşağıdaki uygulamalara hazır hale getirildi.

## Exogen ile düşük yoğunluklu ses dalgası uygulaması

Düşük yoğunluklu ses dalgası kaynağı olarak, ortopedik cerrahide kaynamama ve kaynama gecikmelerinin tedavisinde kullanılması önerilen Exogen cihazı (Exogen 3000, Smith & Nephew Inc., Memphis, TN, ABD) kullanıldı. Cihaz düşük yoğunluklu (30-161 mW/cm<sup>2</sup>) ve yüksek frekanslı (1.5 mHz) ses dalgası üretmektedir.

*S. aureus* suşu bulunan tüpler, düşük yoğunluklu ses dalgası uygulaması için, aynı anda kullanılabilen Exogen cihazının sayısı kadar üç test ve üç kontrol olacak şekilde altılı gruplar halinde işleme sokuldu. Her bir gruptan üçer tüpün altına Exogen cihazının probu yerleştirildi. Prob yerleştirilmeden önce, akustik basıncın tüp içindeki bakterilere etkin transferini sağlamak için ultrason jeli kullanıldı. Üç adet test tüpüne 20 dakika düşük yoğunluklu ses dalgası uygulaması sırasında kontrol tüpleri aynı ortamda 20 dakika bekletildi. Uygulama sırasındaki ısı değişimleri *thermocouple* probu ile kaydedilip izlendi.<sup>[10]</sup>

## Mikrobiyolojik değerlendirme

Ses dalgası uygulamasından sonra, kalibrasyon lupları yardımı ile her iki gruptaki bakteri süspansiyonlarının kanlı agar plaklarına ekimi yapıldı ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bakteri süspansiyonlarındaki koloni sayısı, agar plakta kültür koloni sayım yöntemi ile ve CFU/ml (colony forming unit/ml) cinsinden değerlendirildi.

Antibiyotik duyarlılık testi, Muller-Hinton agar üzerinde Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. Suşların penisilin (10 U, Oxoid Ltd, Basingstoke, İngiltere), oksasilin (1 µg, Oxoid), teikoplanin (30 µg, Oxoid), eritromisin (15 µg, Oxoid), klindamisin (2 µg, Oxoid), levofloksasin (5µg, Oxoid), vankomisin (30 µg, Oxoid) ve siprofloksasine (5 µg, Oxoid) duyarlılıkları NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) ölçütlerine göre değerlendirildi.<sup>[11]</sup> Antibiyotik duyarlılık durumları belirlenirken zon çapları kaydedilmedi.

Genotipleme, AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) ile yapıldı. DNA izolasyonu ve ekstraksiyonu, Güdücüoğlu ve ark.nın<sup>[12]</sup> önerdikleri protokole göre yapıldı. Amplifikasyonda ise M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') primeri kullanıldı.<sup>[13]</sup> Elde edilen PCR ürünü etidyum bromürlü %1.8 aga-

roz jelde, ultraviyole ışık altında çıplak gözle değerlendirildi. Suşlardaki bant profilleri arasında benzerlik Dice katsayısına göre değerlendirildi.<sup>[14]</sup> Benzerlik katsayısı %90 ve üzeri olan suşlar aynı genotip, %70-90 arasında olanlar subtip, %70'den düşük olanlar ise farklı genotip olarak değerlendirildi.

### Histolojik değerlendirme

Yirmi dakikalık düşük yoğunluklu ses dalgası uygulamasından sonra bakteri süspansiyonları, bakteri ince yapısının değerlendirilmesi amacıyla histoloji laboratuvarına gönderildi. Değerlendirme, hücre duvarının incelenmesinde en uygun yöntemlerden biri olan elektron mikroskopisi ile yapıldı.

Bakteri süspansiyonları 5000 devir/dakika hızda 5 dakika döndürüldü. Elde edilen pellet üzerine %2.5'lik glutaraldehit konarak hücrelerin yeniden süspansiyonu sağlandı ve +4 °C'de 4 saat bekletildi. Daha sonra, hücreler tamponla yıkandı ve 60 °C'ye ısıtılarak sıvılaştırılmış agar ile karıştırıldı. Ardından, oda ısısına düşürülerek katılaştırılan agardan kesilen 1 mm<sup>3</sup>lük parçalar kesilerek rutin takibe alındı ve epoksi rezine gömüldü. Elde edilen bloklardan ultramikrotom (Leica UCT 125, Leica Microsystems GmbH, Viyana, Avusturya) ile 70 nm'lik kesitler alındı. Kesitler, uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandıktan sonra transmisyon elektron mikroskobu (JEOL JEM-1011, Jeol Ltd. Tokyo, Japonya) ile incelendi ve bu mikroskoba takılı dijital kamera (Megaview III, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Almanya) ile görüntüler alındı.

Bakteri duvar kalınlıkları, rastgele seçilen 13 tane test ve 15 tane kontrol grup bakteride grafik düzenleyici yazılım (iTEM 5.0, Soft Imaging System GmbH, Münster, Almanya) kullanılarak ölçüldü.

### İstatistiksel değerlendirme

İki gruba ait sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında bağımsız örneklem t-testi kullanıldı. Değerlendirmede SPSS 10.0 yazılımı kullanıldı. Anlamlılık düzeyi olarak p<0.05 alındı.

### Sonuçlar

Uygulama sonrasında, test grubundaki ortalama bakteri sayısı (3.66 log<sub>10</sub> CFU/ml), kontrol grubuna (5 log<sub>10</sub> CFU/ml) göre anlamlı derecede düşük bulundu (p<0.001).

Antibiyotik duyarlılık testinde, her iki grupta da kullanılan antibiyotiklere karşı direnç saptanmadı.

AP-PCR yöntemiyle yapılan analizde, düşük yoğunluklu ses dalgalarının herhangi bir genetik değişikliğe neden olmadığı saptandı (Şekil 1).

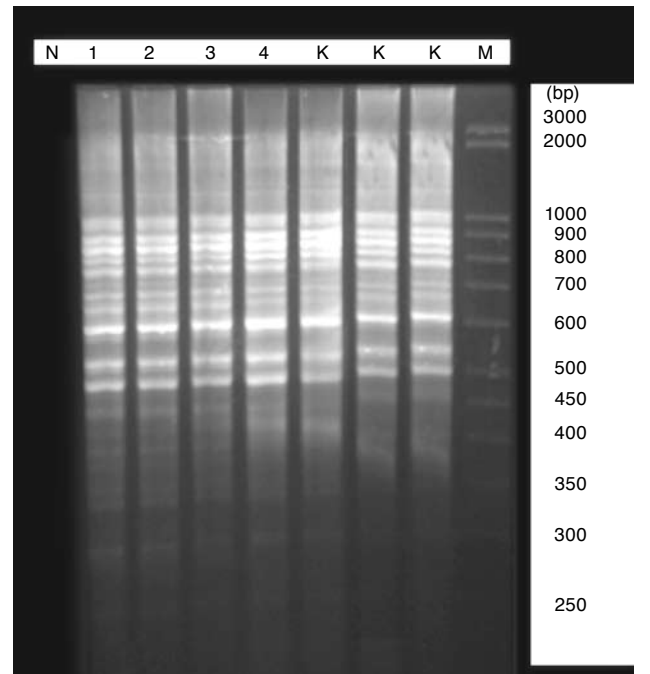
Tüplerin ısı takiplerinde gruplar arasında anlamlı fark oluşmadı (kontrol grubu ort. 24.4±0.5 °C, test grubu ort. 23.2±0.6 °C; p=0.35).

Elektron mikroskopisi ile yapılan histolojik incelemede, kontrol grubundaki bakterilerin hücre duvarı yapılarının normal olduğu ve bakterilerin çoğunun mitoz aşamasında olduğu gözlemlendi; test grubunda ise bazı bakterilerin hücre duvarlarında kısmi yıkım veya parçalanma görüldü (Şekil 2). Bakteri duvar kalınlık ölçümlerinde, ortalama duvar kalınlığı test grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazla bulundu (sırasıyla, 41.54 nm ve 24.27 nm, p<0.001).

### Tartışma

Çalışmamızda, Exogen cihazı ile 20 dakikalık düşük yoğunluklu ses dalgası uygulamasının bakteri sayısı ve morfolojisinde anlamlı değişikliklere neden olduğu görüldü. Öte yandan, uygulama sonrasında canlı kalan bakterilerin antibiyotik duyarlılık ve genomik yapısında bir değişiklik saptanmadı.

Ses dalgalarının bakterisidal ve dezenfektan etkilerinden tıbbi cihazların sterilizasyonunda, yiyecek ve su sektöründe oldukça sık yararlanılmaktadır.<sup>[2,15]</sup>



Şekil 1. Test (1-4) ve kontrol gruplarının (K-K-K) AP-PCR bant profilleri. M: Marker sütünü.

**Tablo 1.** Çeşitli çalışmalarda uygulanan ses dalgasına karşılık ölen mikroorganizma miktarları

	Uygulanan ses dalgası	Süre	Mikroorganizma ölümü
Scherba ve ark. <sup>[16]</sup> 1991	1 W/cm <sup>2</sup> , 24 kHz	2 dk	%22
	3 W/cm <sup>2</sup>	30 dk	%39
Mason ve ark. <sup>[1]</sup> 2003	27 kHz	60 dk	%70
	27 kHz	5 gün	%85
Rediske ve ark. <sup>[3]</sup> 1999	300 mW/cm <sup>2</sup> , 28.48 kHz	24 saat	3.61 log <sub>10</sub>
Bu çalışma	30-161 mW/cm <sup>2</sup> , 1.5 MHz	20 dk	%26.8

Ses dalgalarının bakterisidal etkinliğine etki eden faktörler arasında bakteri duvar kalınlığı, bakteri yoğunluğu, uygulanan ses dalgasının frekans ve yoğunluğu ile uygulama alanı ve süresi sayılabilir.<sup>[1,2,16]</sup> Çeşitli çalışmalarda ses dalgası uygulamasıyla elde edilen bakterisidal etkinlik Tablo 1'de özetlenmiştir.

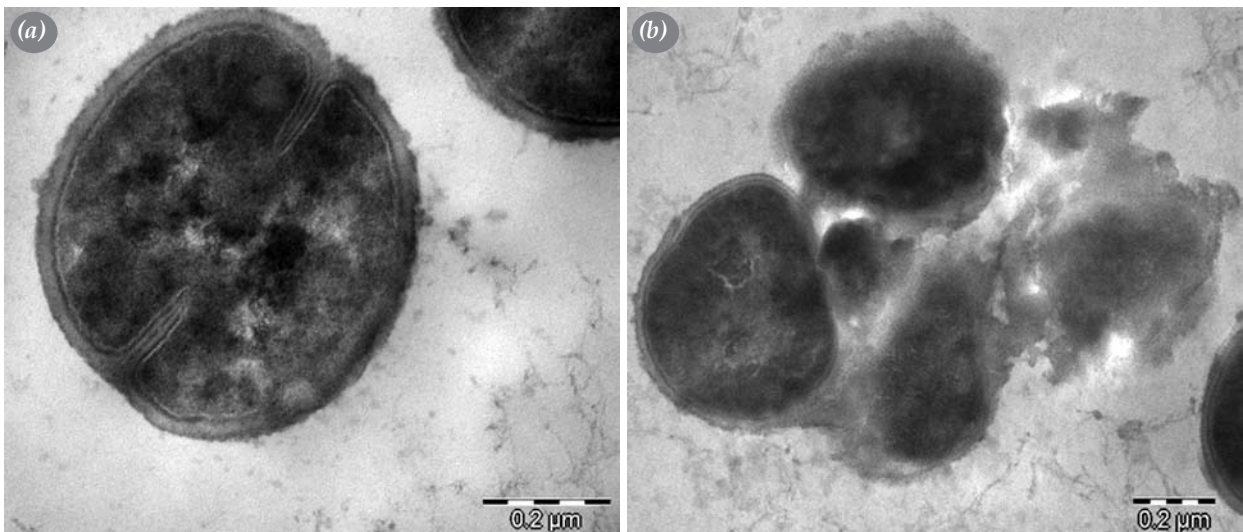
Çalışmamızda histolojik olarak yaptığımız bakteri hücre duvarı incelemeleri sonucunda, test grubundaki bakterilerin gerek hücre duvarlarının parçalanmış görülmesi, gerekse hücre duvarının daha kalın bulunması, ses dalgalarının bakteri hücre duvarını parçalayarak bakterisit etki gösterdiği yönündeki bilgiyi desteklemektedir.<sup>[2]</sup> Parçalanmış bakterilerde bakteri hücre duvarının sağlam bakterilerden daha kalın bulunması paradoksal gibi görünse de, bunun nedeni bakteri duvarının dağılarak daha gevşek bir hal almasıdır.

Rediske ve ark.<sup>[3]</sup> düşük frekans (28.8 kHz) ve düşük yoğunluklu (100-300 mW/cm<sup>2</sup>) ses dalgası uygulamasının, biyofilm üzerindeki bakteri sayısını 6.0

log<sub>10</sub> CFU/ml kadar azalttığını saptamışlardır. Aynı çalışmada, sadece antibiyotik uygulamasıyla karşılaştırıldığında, ses dalgası ile birlikte antibiyotik uygulamasının biyofilm üzerindeki bakteri sayısını 2.39 log<sub>10</sub> CFU/ml kadar azalttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda, uygulama sonrasında yaşayan bakteri sayıları bakımından test ve kontrol grupları arasında anlamlı fark olduğu; ancak, bakteri süspansiyonlarında tam eradikasyona ulaşılamadığı görüldü. Çalışmamızın sonuçları bu açıdan Rediske ve ark.nın<sup>[3]</sup> bildirdiği bulgularla örtüşmektedir.

Yüksek yoğunlukta ve daha uzun süreli ses dalgası uygulandığında daha yüksek oranda bakteri eradikasyonu sağlandığı gösterilmiştir.<sup>[1,2,16]</sup> Yine beklenildiği üzere, ses dalgası uygulamasının etkinliği küçük hacimlerde daha hızlı olmakta ve daha fazla ölüme yol açmaktadır.<sup>[17]</sup>

Ses dalgalarının mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etkileri olduğu, hayvanlar üzerinde DNA bozucu etki gösterdiği ve 58 °C'nin üzerindeki sürekli



**Şekil 2.** (a) Kontrol grubu: Normal morfolojili, bölünen bir bakteri (x120 000). (b) Test grubu: Parçalanmış bakteri hücresi ve duvarı (x75 000).

**Tablo 2.** Çeşitli çalışmalarda uygulanan ses dalgasıyla DNA hasarı arasındaki ilişki

	İnceleme yeri	Ses dalgası özellikleri	DNA hasarı
Cooter ve ark. <sup>[5]</sup> 2001	İnsan lenfositleri,	20-50 kHz, 10-300 W/cm <sup>2</sup>	Var
Shintaku ve ark. <sup>[8]</sup> 1993	İnsan kromozomları Fare fetal karaciğer hücreleri	2 MHz, 160.0-586.2 mW/cm <sup>2</sup> (10 dk)	Var
Stella ve ark. <sup>[9]</sup> 1984	İnsan lenfositleri	0.860 MHz, 1 W/cm <sup>2</sup> (40-160 sn)	Var/Yok
Garaj-Vrhovac ve Kopjar <sup>[6]</sup> 2005	Mesleki olarak ultrasona maruz kalmış kişilerde periferik kan lenfositleri	1-10 MHz, 0.05 W/cm <sup>2</sup>	Var
Miller ve ark. <sup>[7]</sup> 1989	İnsan lökositleri	1.45 MHz, 161 W/cm <sup>2</sup> (40-160 sn)	Var
Takabayashi ve ark. <sup>[18]</sup> 1985	Fare embriyosu	250, 500, 1000 Hz, >60 W/cm <sup>2</sup> (5 dk) 250, 500, 1000 Hz, <60 W/cm <sup>2</sup> (5 dk)	Var Yok
Şahin ve ark. <sup>[22]</sup> 2004	İnsan lenfositleri	1 MHz (10 dk)	Yok
Miller ve ark. <sup>[23]</sup> 1991	Terapötik USG İnsan lenfositleri	>1 MHz, 0.5-3 W/cm <sup>2</sup>	Yok

uygulamalarda bu etkilerin kesin olduğu bildirilmiştir.<sup>[18]</sup> Çalışmamızda termoçift ile yapılan ısı monitörizasyonu sonucunda, test grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir sıcaklık değişimi farkı gözlenmedi. Kullandığımız cihaz yüksek frekanslı dalgalar üretebilme kapasitesine sahip olduğu halde, literatürde belirtildiğinin aksine,<sup>[19]</sup> oluşan ısı 60 °C'nin üzerine çıkmamıştır.

Düşük yoğunluklu ses dalgası uygulanan tüplerde canlı kalan bakterilere disk difüzyon yöntemiyle yapılan antimikrobiyal duyarlılık ölçümlerinde, test ile kontrol grupları arasında fark görülmedi. Ses dalgalarının biyofilm tabaka üzerindeki etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, mikrokonveksiyon, kavitasyon ve türbülans gibi mekanik etkilerle biyofilm tabaka kalınlığını azaltıp biyofilm içine oksijen ve antibiyotik girişini sağladığı ve dolayısıyla antibiyotik etkinliğini artırdığı ileri sürülmüştür.<sup>[20]</sup> İmplantla ilişkili ve biyofilm tabakaları nedeniyle antibiyotik etkinliğinin sınırlı olduğu enfeksiyonlar için proteolitik enzimlerin denendiği *in vivo* çalışmalara da rastlanmaktadır.<sup>[21]</sup>

Vollmer ve ark.<sup>[4]</sup> yüksek frekanslı ses dalgalarının, spesifik stres yanıtını uyararak hücre duvarında değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki elektron mikroskopik bulgular da bu savı doğrulamaktadır (Şekil 2). Ancak, bakteri hücre ölümüne veya DNA hasarına neden olacak yeterlikteki ses dalgası yoğunluğu, frekansı veya süresinin ve hücre yıkımı için gerekli köpük-kabarcık miktarının ne olması gerektiği konusunda fikir birliği bu-

lunmamaktadır.<sup>[4]</sup> Ses dalgası uygulamalarının DNA hasarıyla ilişkisine dair literatür verileri Tablo 2'de özetlenmiştir.

Bazı araştırmacılar<sup>[5]</sup> düşük frekans ve düşük yoğunlukta (20-50 kHz, 10-300 W/cm<sup>2</sup>), bazı araştırmacılar<sup>[8]</sup> ise yüksek frekans ve düşük yoğunlukta (2 MHz, 160-586.2 mW/cm<sup>2</sup>) uygulanan ses dalgaları sonrasında, insan lenfosit ve fetal karaciğer hücrelerinde DNA hasarı oluştuğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, düşük frekans ve yoğunlukta (250-1000 kHz, 60 W/cm<sup>2</sup>) uygulanan ses dalgası ile DNA hasarı oluşmadığını bildiren çalışmalar da vardır.<sup>[18,22,23]</sup> Çalışmamızda da, yüksek frekans ve düşük yoğunluklu ses dalgası (1.5 mHz, 30-161 mW/cm<sup>2</sup>) uygulamasıyla bakteri DNA'sında hasar gözlenmemiştir.

Test ve kontrol grupları, AP-PCR analitik yöntemi kullanılarak karşılaştırıldığında, iki grup arasında genetik yapı bakımından fark saptanmadı (Şekil 1). Bununla birlikte, AP-PCR tekniğinin izolatlar arası genotipik değişikliklerin belirlenmesi için daha uygun olduğu göz önüne alındığında, düşük yoğunluklu ses dalgalarına maruz kalan hücrelerin DNA *string* analizi gibi ileri tekniklerle araştırılması, bu hücrelerde olası küçük genetik hasarlara ilişkin bilgi sağlayabilir.

Tek bir bakteri türünün ele alınması ve farklı süre, frekans ve yoğunlukta ses dalgalarının kullanılmamış olması çalışmanın en önemli kısıtlılıklarıdır. Tek seans ses dalgası uygulayarak elde ettiğimiz bu verilerin, *in vitro* bir önçalışmanın sonucu olarak ele alınıp, tekrarlayan ses dalgası uygulamalarının ve *in*

*vivo* etkilerin araştırıldığı çalışmalara temel oluşturabileceği kanısındayız. Ses dalgası uygulamalarının ortopedi pratiğinde karşılaşılan enfeksiyonlarda adjuvan tedavi olarak kullanılabilirliği araştırmaya değer bir konudur.

Sonuç olarak çalışmamızda, Exogen cihazı ile 20 dakikalık düşük yoğunluklu ses dalgası uygulamasının *S. aureus* sayı ve morfolojisinde anlamlı değişikliklere neden olurken, geride kalan canlı bakterilerin antibiyotik duyarlılığı veya genomik yapısına etki etmediği görüldü. Bununla birlikte, ses dalgaları yoluyla mikroorganizmaların parçalanıp sayısının azalması, antibiyotik etkisini dolaylı olarak artırabilir.

### Kaynaklar

- Mason TJ, Joyce E, Phull SS, Lorimer JP. Potential uses of ultrasound in the biological decontamination of water. *Ultrason Sonochem* 2003;10:319-23.
- Piyasena P, Mohareb E, McKellar RC. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int J Food Microbiol* 2003;87:207-16.
- Rediske AM, Roeder BL, Brown MK, Nelson JL, Robison RL, Draper DO, et al. Ultrasonic enhancement of antibiotic action on *Escherichia coli* biofilms: an in vivo model. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1211-4.
- Vollmer AC, Kwakye S, Halpern M, Everbach EC. Bacterial stress responses to 1-megahertz pulsed ultrasound in the presence of microbubbles. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3927-31.
- Cooter R, Babidge W, Mutimer K, Wickham P, Robinson D, Kiroff G, et al. Ultrasound-assisted lipoplasty. *ANZ J Surg* 2001;71:309-17.
- Garaj-Vrhovac V, Kopjar N. Investigation into possible DNA damaging effects of ultrasound in occupationally exposed medical personnel-the alkaline comet assay study. *J Appl Toxicol* 2005;25:184-92.
- Miller DL, Reese JA, Frazier ME. Single strand DNA breaks in human leukocytes induced by ultrasound in vitro. *Ultrasound Med Biol* 1989;15:765-71.
- Shintaku Y, Takabayashi T, Sasaki H, Ozawa N, Yajima A. Sister chromatid exchanges in mouse after exposure to pulse-wave ultrasound in utero. *Tohoku J Exp Med* 1993;170:63-9.
- Stella M, Trevisan L, Montaldi A, Zaccaria G, Rossi G, Bianchi V, et al. Induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes exposed in vitro and in vivo to therapeutic ultrasound. *Mutat Res* 1984;138:75-85.
- Nolte PA, van der Krans A, Patka P, Janssen IM, Ryaby JP, Albers GH. Low-intensity pulsed ultrasound in the treatment of nonunions. *J Trauma* 2001;51:693-702.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 6th ed. Approved standard, NCCLS document M2-A6. NCCLS: Pennsylvania; 1997.
- Guducuoglu H, Ayan M, Durmaz R, Berktaş M, Bozkurt H, Bayram Y. Epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* strains from nasal carriers in a teaching hospital. *New Microbiol* 2002;25:421-6.
- Durmaz R, Ayan M. *Acinetobacter baumannii* izolatlarının moleküler epidemiyolojisinde "arbitrarily primed" PZR ve "pulsed-field gel" elektroforezi. In: Durmaz R, editör. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji. 2nd ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001. p. 219-28.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.
- Pitt WG, Ross SA. Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnol Prog* 2003;19:1038-44.
- Scherba G, Weigel RM, O'Brien WD Jr. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:2079-84.
- Joyce E, Phull SS, Lorimer JP, Mason TJ. The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrason Sonochem* 2003;10:315-8.
- Takabayashi T, Sato S, Sato A, Ozawa N, Sou S, Yajima A, et al. Influence of pulse-wave ultrasonic irradiation on the prenatal development of mouse. *Tohoku J Exp Med* 1985;147:403-10.
- Carmen JC, Nelson JL, Beckstead BL, Runyan CM, Robison RA, Schaalje GB, et al. Ultrasonic-enhanced gentamicin transport through colony biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *J Infect Chemother* 2004;10:193-9.
- Carmen JC, Roeder BL, Nelson JL, Beckstead BL, Runyan CM, Schaalje GB, et al. Ultrasonically enhanced vancomycin activity against *Staphylococcus epidermidis* biofilms in vivo. *J Biomater Appl* 2004;18:237-45.
- Mecikoglu M, Saygi B, Yildirim Y, Karadag-Saygi E, Ramadan SS, Esemeli T. The effect of proteolytic enzyme serratiopeptidase in the treatment of experimental implant-related infection. *J Bone Joint Surg [Am]* 2006;88:1208-14.
- Sahin O, Donmez-Altuntas H, Hizmetli S, Hamurcu Z, Imamoglu N. Investigation of genotoxic effect of ultrasound in cases receiving therapeutic ultrasound by using micronucleus method. *Ultrasound Med Biol* 2004;30:545-8.
- Miller MW, Azadniv M, Cox C, Miller WM. Lack of induced increase in sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to in vivo therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1991;17:81-3.