



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE  
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

T.C. YÜSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

107873

PATOJEN ESCHERİCHİA COLİ SUŞLARINDA SİDEROFOR VE DİĞER  
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE PATOJENİTEDEKİ  
ROLLERİNİN CİLT İNFEKSİYON MODELİYLE GÖSTERİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

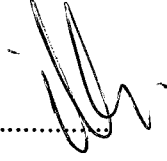
Dr. Melek DEMİR

2001

DENİZLİ

. çalışma, Jürimiz tarafından MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM  
F'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

an... Doç. Dr. İlknur Kaleli.....



... Doç. Dr. Hüseyin Turgut.....



... Doç. Dr. Hermann Aydın.....



... Doç. Dr. Ö. Levent Tuncay.....



... Yrd. Doç. Dr. Mustafa Senpül.....



arıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.



...../...../2001  
Prof. Dr. Hüseyin BİDİR  
DEKAN

## TEŞEKKÜR

Bilimsel çalışma, doğaya sorulan bir sorunun yanıtını merakla, heyecanla, gözlemleyerek anlamaya çalışmak, sorgulamak ve sonuçlardan deneyimler edinmek; eğitim, bilgilerin ve deneyimlerin aktarılması, paylaşılmasıydı. Bu çalışma sırasında her sorunun yanıtını benimle birlikte heyecanla merakla bekleyen, bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşan ve aktaran tez danışman hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. İlknur Kaleli'ye ve eğitim sürecindeki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Mustafa Şengül, Doç. Dr. Hüseyin Turgut, Doç. Dr. Ata Nevzat Yalçın ve Yrd. Doç. Dr. Banu Çetin'e,

Bilimsel çalışma yoğun emeğin yanında maddi desteği de gerektiriyordu; desteklerinden dolayı Pamukkale Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığı'na,

Paylaşma bilimsel çalışmanın bir parçasıydı; mutant suşlar için İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mine Anğ Küçükler ve Uzman Serdar Susever ve deneysel çalışmadaki katkıları için Denizli Tarım İl Müdürlüğü hayvan laboratuvarı çalışanlarına,

Araştırma süreci bölümler arası işbirliğini gerektiriyordu; katkıları için Yrd. Doç. Dr. Süleyman Demir ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet Zencir'e,

Bilimsel çalışma yardımlaşma ve dayanışma demektir; Yrd. Doç. Dr. Cüneyt Orhan Kara, Yrd. Doç. Dr. Esat Adıgüzel, Uzm. Dr. Nural Cevahir, Dr. Ferzan Doğruöz, Dr. Meral Maralcan, Dr. Ergun Mete, Dr. Sülal Öztürk, Dr. Funda, Cabar, Dr. Yusuf Polat ve Nesrin Ay'a,

Uyumlu çalışma ortamı bu sürecin bir parçasıydı; bu sürece katkıları için, Nilgün Arıkan, İbrahim Çırnaz, Figen İşleten, Yasemin Dülgeroğlu, Zahide Atalay ve Musa Arıkan'a teşekkür ediyorum.

Ve yaşam sevmek; sevgileri için eşim Süleyman ve kızım Özümcan'a teşekkürler.

**Dr. Melek DEMİR**

## İÇİNDEKİLER

GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
TARİHÇE.....	3
GÖRÜNÜM VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ.....	3
ÜREME VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	3
ANTİJENİK ÖZELLİKLER.....	4
<i>O Antijeni</i> .....	4
<i>H Antijeni</i> .....	4
<i>K Antijeni</i> .....	4
<i>L Antijeni</i> .....	4
<i>A Antijeni</i> .....	5
<i>B Antijeni</i> .....	5
<i>Fimbria Antijeni</i> .....	5
VİRULANS VE PATOJENİTE ÖZELLİKLERİ.....	5
<i>Bakterial Aderans</i> .....	6
<i>Fimbrial Adezinler</i> .....	6
<i>Tip 1 Fimbria</i> .....	7
<i>Mannoz rezistans Fimbrialar (MR)</i> .....	7
<i>P Fimbria</i> .....	8
<i>X Adezinler</i> .....	8
<i>Afimbrial adedinler</i> .....	9
<i>Sideroforlar</i> .....	9
<i>Aerobaktin</i> .....	11
<i>Enterobaktin</i> .....	13
<i>Lipopolisakkarid</i> .....	14
<i>Kapsuler Polisakkarid</i> .....	14
<i>Hemolizinler</i> .....	15

<i>Serum Direnci</i> .....	15
<i>İnaktif Serumda Üreme</i> .....	16
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	17
<b>VİRULANS FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI</b> .....	17
<i>Hemaglutinasyon (HA) ve MannoZ Rezistans Hemaglutinasyon (MRHA)</i> .17	
<i>SiderofoR Üretimi</i> .....	18
<i>Aerobaktin Tip SiderofoR Aranması</i> .....	18
<i>Enterobaktin Tip SiderofoR Aranması</i> .....	22
<i>Hemolizin Varlığı</i> .....	25
<i>Serumun Bakterisidal Etkisine Direnç</i> .....	25
<i>İnaktif Serumda Üreyebilme Özelliği</i> .....	25
<b>ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ</b> .....	26
<b>DENEY HAYVANLARINDA PATOJENİTENİN ARAŞTIRILMASI</b> .....	26
<b>İSTATİSTİKSEL YÖNTEM</b> .....	27
<b>BULGULAR</b> .....	28
<i>I-Virulans Faktörleri</i> .....	28
<i>II-Deneysel cilt infeksiyonu Modeli</i> .....	39
<b>TARTIŞMA</b> .....	42
<b>SONUÇLAR</b> .....	60
<b>ÖZET</b> .....	63
<b>YABANCI DİL ÖZETİ</b> .....	64
<b>KAYNAKLAR</b> .....	65

## TABLolar ÇİZELGESİ

Tablo I: Çalışmaya alınan suşların cinsiyet , yaş, poliklinik/ servis ve örnek tipine göre dağılımı .....	28
Tablo II: Hemolizin üretiminin örneklere göre dağılımı.....	29
Tablo III: Örneklerin hemaglutinasyon özellikleri.....	30
Tablo IV: Suşların MRHA ve MSHA oluşturma özellikleri.....	30
Tablo V: Örneklerin serum direnci özellikleri.....	31
Tablo VI: Örneklerin inaktif serumda üreme özellikleri.....	32
Tablo VII : Üropatojen, diğer örneklerden ve gaita örneklerinden soyutlanan . E. coli suşlarında aerobaktin ve enterobaktin tip sideroforların varlığı.....	33
Tablo VIII: Aerobaktin üretimi ile diğer virulans faktörlerinin ilişkisi.....	35
Tablo IX: Hemolizin üretimi ile MRHA varlığı.....	37
Tablo X: İdrar, diğer kaynaklı ve gaita örneklerinden soyutlanan E.coli suşlarında çeşitli antibakteriyel maddelere direnç.....	38
Tablo XI: İdrar örneklerinden soyutlanan 86 aerobaktin üreten ve 38 üretmeyen E.coli suşunda çeşitli antibakteriyel maddelere direnç.....	39
Tablo XII: Hayvan deneyinde oluşturulan gruplarda ortalama üreyen E. coli miktarı.....	40
Tablo XIII: Grupların istatistiksel değerlendirme sonuçları.....	41

## ŞEKİLLER VE RESİMLER ÇİZELGESİ

Şekil 1: Aerobaktin ve enterobaktin sistemi.....	12
Şekil 2: Aerobaktin sentezi.....	13
Resim 1: Pozitif, negatif kontroller ve aerobaktin pozitif suşlar .....	21
Resim 2: Aerobaktin pozitif ve negatif suşlar.....	21
Resim 3: Pozitif, negatif kontroller ve enterobaktin pozitif suşlar.....	24
Resim 4: Enterobaktin pozitif .....	24



## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ABU</b>	: Asemptomatik bakteriüri
<b>AFA</b>	: Afimbrial adezin
<b>EMB</b>	: Eosin metilen blue
<b>HA</b>	: Hemaglütinasyon
<b>HBSS</b>	: Hanks'in dengeli tuz solüsyonu
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>MRHA</b>	: Mannoz rezistans hemaglütinasyon
<b>MSHA</b>	: Mannoz sensitif hemaglütinasyon
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu solüsyon
<b>ÜSİ</b>	: Üriner sistem infeksiyonu





## GİRİŞ

Barsakların normal flora üyesi, fakültatif anaerob, gram negatif bir basil olan *Escherichia coli* (*E. coli*) aynı zamanda insan için önemli bir fırsatçı patojendir (1,2,3,4). Konağın savunma mekanizmasının zayıfladığı durumlarda idrar yolu infeksiyonu, barsak ve barsak dışı infeksiyonlara neden olmaktadır (4,5,6). Gram negatif sepsise ve endotoksemiye bağlı şokta en sık etken mikroorganizma *E. coli*'dir. Yara infeksiyonu, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda pnömoni ve yeni doğanlarda menenjit etkeni olarak da *E. coli* soyutlanmaktadır (1). Barsak dışı infeksiyon oluşturan suşlar ile normal flora elamanı olan suşlar arasındaki infeksiyon oluşturma yetenekleri arasındaki fark virulans faktörleri ile açıklanmaktadır (3).

Üriner sistem infeksiyonu *E. coli*'lerin neden olduğu barsak dışı infeksiyonların en sık görülen şeklidir (1,2,7). Üriner sistem infeksiyonlarında en sık rastlanan etken üropatojen *E. coli* suşlarıdır (1,2,3). Tüm bakteriler üriner sistemde aynı derecede inflamasyona yol açmazlar. Bazı üriner patojenler avirulan ve fırsatçı olup, yalnızca konağın savunma sistemi baskılandığında infeksiyon oluştururlar. Bazıları ise sahip oldukları bazı virulans faktörleri sayesinde kolon florasından geçerek üriner sisteme ulaşır ve burada infeksiyon oluşturabilirler (8). Üriner sistem infeksiyonlarının patogeneğinde konağa ait faktörler ve bakterinin virulans faktörleri önemlidir. Bakterilerin infeksiyon oluşturabilmesi için, öncelikle üriner sistem epitel hücrelerine yapışması gerekir. Fimbrialar yapışmadan sorumlu en önemli bakteri yüzey adezinleri olarak bilinmektedirler (9,10). Hemolizinler eritrositi parçalama yeteneklerine göre sınıflandırılan sitotoksik proteinlerdir. Hemolizin üretiminin üropatojen *E. coli* suşlarında virulans faktörü olduğu bildirilmiştir (11,12). Serumda bulunan komplemanlar bakterilerin öldürülmesine katkıda bulunurlar (3,13,14). Bazı bakteriler serumun bu öldürücü etkisine karşı direnç oluştururlar. *E. coli*'lerde de bulunan ve patojeniteyi belirleyen bu direnç serum direnci olarak bilinir (15,16). İnaktif serumda üreyebilme yeteneği *E. coli* suşları için virulansı artırıcı bir özellik olarak bildirilmektedir (17).

Vücut sıvılarında çok az miktarda bulunan serbest demiri bağlayabilme ve hücre içine alabilme yeteneği bakterilerin önemli virulans faktörlerinden biridir (18,19,20). Patojen bakteriler konaktaki proteinlere bağlı demiri kullanabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Bunların içinde en bilineni sideroforlardır (18,20,21). Sideroforlar demir bağlama yeteneği olan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (22,23,24,25). Patojen E. coli suşlarında siderofor varlığı önemli bir virulans özelliğidir (11,15,19). Barsak bakterilerinde enterobaktin (fenolat) ve aerobaktin (hidroksamat) olmak üzere iki tip siderofor tanımlanmıştır (20,25,26). Septisemili ve üriner sistem infeksiyonlu hastalardan soyutlanan E. coli suşlarında aerobaktin üretimi yüksek bulunmuştur (11). Sideroforların biyoaktif gruplarının antimikrobiyal ajanlara eklenmesi ile yeni tedavi protokollerinin oluşturulabileceği ileri sürülmüştür (18,27).

Bu çalışmada, idrar yolu infeksiyon etkeni olarak soyutlanan üropatojen E. coli suşlarında, diğer sistemlerden infeksiyon etkeni olarak soyutlanan ve normal flora elemanı olarak gaitadan soyutlanan E. coli suşlarında siderofor ve diğer virulans faktörlerinin varlığının araştırılması, antibakteriyel maddelere duyarlılığının test edilmesi ve sideroforların varlığı ile diğer virulans faktörleri ve antibakteriyel maddelere direnç arasındaki ilişkinin ortaya konması ve siderofor üretiminin patojenitedeki rolünün deneysel olarak cilt infeksiyonu oluşturularak araştırılması amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### TARİHÇE

Escherich 1885-1886 yıllarında yeni doğan bebeklerin dışkılarından bir bakteri izole ederek özelliklerini tarif etmiş ve *Bacterium coli commune* adını vermiştir. Daha sonraları bu bakteri *Bacterium coli* olarak isimlendirilmiş ve son olarak *Escherichia coli* olarak sınıflandırmada yerini almıştır (9).

*Escherichia* cinsi içinde yer alan en önemli tür *E. coli*'dir (1,2,4). *E. coli* üzerinde en çok çalışılan mikroorganizmalardan biridir. *E. coli* kalın barsak florası içinde en yaygın olarak bulunan fakültatif anaerob türdür (2).

### GÖRÜNÜM VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ

*E. coli* yaklaşık olarak 2-6 µm boyunda, 0.6-1.5 µm eninde düz, uçları yuvarlak basil şeklinde bakterilerdir (1,2,5,9). Peritriş kirpikleri ile çoğu hareketli olmakla birlikte hareketsiz olan suşlar da vardır. Bazı suşlar kapsüllüdür ve katı besiyerlerinde mukoid koloniler oluştururlar (1,2,4). Spor oluşturmazlar (9). Bakteriolojik boyalar ile iyi boyanır ve gram negatiftirler (2,9).

### ÜREME VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Fakültatif anaerop bir bakteridir. Kan, serum, asit sıvısı, glukoz gibi maddeler ilave edilmemiş adi besiyerlerinde kolaylıkla ürerler. Optimal üreme ısısı 37 °C, optimal pH 7-7.2'dir. Ancak 20-44°C ve pH 5-8 arasında da ürerler (2,5,9). Özellikle 44°C'de üreyebilmeleri benzer bazı bakterilerden ayırt edici bir özelliktir (5).

Kanlı agarda hafif nemli görünümlü, 1-2 mm çapında gri koloniler yapar. McConkey agarda kuru, pembe-kırmızı (laktoz pozitif), 2-3 mm çapında koloniler oluşturur. EMB agarda laktoz pozitif metalik koloniler oluşur.

*E. coli* glukoz, maltoz, mannitol, ksiloz, ramnoz, arabinoz, sorbitol, treholoz, ve gliserolü asit ve gaz yaparak parçalar. Sükroz, salisin dülsitol ve rafinoz üzerine etkisi değişkendir. Nişastadan gaz oluşturmaz. H<sub>2</sub>S, DNase, ureaz ve fenilalanin deaminaz oluşturmaz. Potasyum siyanürlü besiyerinde üremez, nitratları nitritlere çevirmez. Karbon kaynağı olarak sitratı kullanmaz. Triptofandan indol oluşturur, metil kırmızısı testi pozitif, Voges-proskauer testi negatif, sitrat testi negatiftir. İMVİC testi (++--)’dir (1,2,4,5).

### ANTIJENİK ÖZELLİKLER

*E. coli*’nin somatik (O), kirpik (H) ve kapsül (K) antijenleri vardır. Kauffman tarafından geliştirilen serotip şemasına göre 171 O grup, 57 H ve 90 K grubu vardır (2). Antijen yapılarının belirlenmesi özellikle epidemiyolojik çalışmalarda yararlıdır.

#### *O Antijeni*

Isıya dayanıklı somatik antijendir. Polisakkarid-fosfolipid-protein kompleksidir. Isıya ve alkole dirençli, formaldehide ise dayanıksızdır (2,5,9).

#### *H Antijeni*

Kirpik antijenidir ve protein yapısındadır. Monofazik yapıdadır. Isıya, alkole ve proteolitik enzimlere dayanıksız, formaldehide dayanıklıdır (2,5,9).

#### *K Antijeni*

Bir çok *E. coli* suşunda bulunan, polisakkarid yapısında kapsül ve zarf antijenidir. Üç tip K antijeni tanımlanmıştır. Bunlar L, A ve B antijenleridir (2,7,9).

#### *L Antijeni*

Isıya dayanıksız bir antijendir. Bu antijene sahip suşların kolonileri daha opaktır. Bu antijenin bulunduğu *E. coli* suşları genellikle hemolitik ve fareler için toksiktir. Yaklaşık 27 L antijeni tanımlanmıştır (9).

### *A Antijeni*

Kapsüllü bakterilerin polisakkaridleridir. Isıya dayanıklıdır. A antijenine sahip suşların kolonileri opak, mukoid, ve M koloni özelliğindedir. Yaklaşık 26 A antijeni vardır (9).

### *B Antijeni*

Her sušta bulunmaz ancak gastroenterit yapan suşlarda bulunur. Isıya dayanıksızdır. Çocuklardaki epidemik diyarelerde etken E. coli suşlarında buldukları gösterilmiştir. L antijenlerine benzer (9).

### *Fimbria Antijeni*

Bakteri yüzeyine yerleşmiş kısa flamanlardır. Bakterilerin serogrupları ve tipleri için özgül değildir. Fimbriyalı bakteriler insan ve değişik hayvan eritrositlerini aglütine etme eğilimindedirler. Katı besiyerlerinde tekrarlanan pasajlarla fimbrialar kaybolabilir. Ancak bakterilerin sıvı besiyerinde üretilmeleri fimbriaların gelişmelerine neden olur (2,5).

## VİRULANS VE PATOJENİTE ÖZELLİKLERİ

Patojenik mikroorganizma diğer mikroorganizmaları kısıtlayan veya inhibe eden hücresel veya sıvısal konak bariyerini kırarak veya bozarak diğer bir türde çoğalma ve canlılığını sürdürebilme kapasitesine sahip bir mikroorganizma olarak tanımlanabilir (3,8). E. coli esas olarak non patojenik bir bakteridir. Patojenik ve nonpatojenik suşlar arasındaki esas farklılık, patojenik suşların virulans faktör üretme kapasitesidir. Bu virulans faktörler temel olarak patogenezele ilgili bakteriyel ürünlerdir (8).

E. coli'nin çeşitli konaklarda ve değişik dokuları infekte edebilmek için çok sayıda virulans faktörü vardır (2,3,8,11,28). Bu virulans faktörler esas olarak patojenik oluşum ile ilgili bakteriyel ürünlerdir. Patojenik oluşumlara göre E. coli türleri 3 sınıfa ayrılabilir. Birinci sınıfta, bir fimbriyal yapıda olmaksızın dış membran proteinlerinin organik olduğu, spesifik adezinlerin üretimi yolu ile mukozal yüzeylere

yapılan E. coli'ler yer alır (8,29). İkinci sınıfı, ökaryotik hücrelerle etkileşerek onların normal fonksiyonlarını bozan proteinler olan toksinleri üreten E. coli'ler oluşturur. Üçüncü sınıf, epitel bariyeri geçip konak dokusunu invaze edebilen E. coli'lerden oluşur. Patojenik E. coli'lerden birçoğu birkaç çeşit patojenik mekanizma ile ilişkilidir. Patojenik E. coli ile konak ilişkisi ya membranla ilişkili veya dış ortama salgılanan E. coli tarafından üretilen virulans faktörlerini gerektirir (8).

Yapılan çalışmalar E. coli'nin patogenezin farklı basamaklarında katkıda bulunan virulans faktörlerine sahip olduklarını göstermektedir. Bu virulans faktörler aderans faktörler (K1 kapsül, tip I fimbria, tip II fimbria. P, S, Dr fimbrialar, X adezinler), sideroforlar (aerobaktin, enterobaktin), toksinler (LPS, hemolizin), serum direnci ve invazyon faktörleri içerir (8,11,28,29) .

#### *Bakteriyel Aderans*

Patojen E. coli suşları, özellikle üropatojenik E. coli üriner sistem infeksiyon (ÜSİ) eğilimi olan konakta mukozal alana yerleşip çoğalır. Konağın mukozal dokularını etkileyen patojenler için bağlanma ilk adımdır. Bağlanma, sistemik kompartmanlarda ve böbrek dokusunda, üriner yol mukozasında hedef hücrelere bağlı reseptörlerin aktivasyonu ile sonuçlanır. Bağlanma konak hücre reseptörleri ve bakteriyel yüzey komponentleri (adezin) arasındaki özgül ilişki ile düzenlenir (3,11,29). Üropatojenik E. coli'nin adezinleri, ya dış membranda nonflemantöz proteinler ya da pili veya fimbria olarak tanımlanan filamentöz yüzey organellerinden biri şeklinde bulunur (11).

#### *Fimbrial Adhezinler*

Bakterilerde kirpikler dışında hareketsiz şekillerde bulunan filamentöz uzantılar vardır. Fimbrialar pek çok sayıda kıvrımsız yapılardır. Genetik madde aktarımında rol almazlar (5). Bu yapılar bakteri yüzeyi ile konak yapı arasında ilişkiyi sağlayarak bakterinin kolonizasyonuna yardımcı olan bakteri yüzeyinde bulunan organellerdir (5,9,11).

### *Tip 1 Fimbria*

Tip 1 veya mannoz duyarlı fimbrial adezinler mannoz içeren reseptörler olarak tanımlanırlar (11). Tip 1 fimbriaların 7 nm çapında, 0.5-2 µm boyunda 17 kDa'luk fibrin subünitlerinden oluşan yapılar olduğu gösterilmiştir (29). Tip 1 fimbria reseptörleri çeşitli canlıların eritrositlerinin yüzeyinde bulunan mannoz içeren glikoproteine bağlanma eğilimindedirler (11,30). Bu bağlanma alfa-metil D mannozid veya D-mannoz solusyonu ile bloke olur (11,31). Tip 1 fimbrialar Tamm Horsefall ve IgA gibi sekrete glikoproteinler üzerindeki mannoz epitoplarına bağlanır (11). Tip 1 fimbrialar yapısal ve düzenleyici proteinleri kodlayan dokuz geni içeren *pil* veya *fim* gen demeti tarafından kodlanırlar. *FimA* fimbria subünit proteinini kodlar ve *FimH*'ın kodladığı adezin proteinlerinden bağımsız olarak eksprese edilebilir. *FimA* ve *FimH* gen ürünleri adhezif fenotiplerine göre adlandırılır ve hücre yüzey bölgelerinde bulunurlar (11,29).

Fim DNA sekansları ile yapılan çalışmalarda çoğu virulan veya avirulan klinik *E. coli* izolatlarında tip 1 fimbria varlığı gösterilmiştir. Bu tip fimbrialar *E. coli*'lerin çoğunda bulunduğundan "Common Pili" olarak isimlendirilirler (7,32). Tip 1 fimbria ile infeksiyonun şiddeti arasındaki ilişkiye ait epidemiyolojik çalışmalar sınırlıdır (11).

### *Mannoz Rezistans Fimbrialar (MR)*

*E. coli* suşlarının adheranslarının mannoz tarafından önlenmeyen fimbrialar da içerdikleri gösterilmiştir. Bu fimbrialar mannoz rezistans fimbrialar olarak isimlendirilmiştir (5,11). Tip 1 fimbriadan daha karmaşıktır ve değişik yapıda adezinler bu ad altında toplanırlar. Bunlara tip II fimbrialar denmektedir (2,11). Bunlar P fimbria, S fimbria, X faktör (Dr hemaglütinin) ve çeşitli kolonizasyon faktörleridir (2). Bu yapılar diğer virulans faktörleri ile yakın ilişki içindedirler (15,33).

### *P Fimbria*

Fimbrial organellerin organizasyonu bu yapıları kodlayan kromozomal DNA sekans çalışmaları ile açıklanmıştır. P sembolü iki nedenden dolayı kullanılmaktadır.

1- Akut pyelonefritte P fimbriyalı E. coli sık olarak saptanmaktadır

2- P kan grup sistemlerinde glukolipidler antijen ve P fimbrialar için bir reseptör gibidir (3,11).

P fimbrialar pap (pyelonephritis associated pili) kromozomal gen demeti ile kodlanmıştır. PapA major fibrilin subünitlerini kodlar ve papE papF ve papG sekansları da adezin komplekslerini kodlar. PapE-papG adezin kompleksleri fimbriaların tepesinde lokalizedir. PapF, PapE-papG subünitine girmede yapının tepesi için uygunluğu ve başlatıcılığı sağlar. Pap C'nin pilusun yerleştiği bir por oluşturduğu ileri sürülmüştür. Pap D birleştirici olarak periplazmik alanda görev görür. PapH fimbrial birleşmeyi sonlandırır ve fimbriyanın bağlanmasına yardım eder. Pap J gen ürününün pilus yapısına papA subünitinin katılımını hızlandırdığı ve Pap K'nın pilus tepesinde lokalize pilin benzeri bir protein olduğu ileri sürülmüştür. Pap B ve Pap I, Pap A transkripsiyonu ile ilişkili düzenleyici proteinleri kodlar (11,29,34).

P fimbria taşıyan E. coli suşları P kan grubu eritrositleri aglütine eder. Hemaglutinasyon mannoz tarafından önlenmez (11).

### *X Adezinler*

Üropatojen E. coli'lerde yeni tanımlanmış bazı adezinler vardır. S pilus ve M pilus iki yeni adezindir. S adezin siyalilgalaktozid yapısındaki glikoproteinlere bağlanır. Bakteriyemi yapan E. coli suşlarında bulunur. Beyin ventriküllerine, koroid pleksusa, ve damar epitelinde bulunan reseptörlere tutunmayı sağlar (2,28).

M adezin ise insanın M kan grubuna özel olan glikoforin A moleküllerine bağlanır. Bu reseptör glikokonjugatının pilus bağlanma yeri galaktoz, N-asetil galaktozamin sialik asit ve serin artıklarından oluşmaktadır. Bu adezinler Dr kan



grubu antijenlerine tutunmayı sağladıklarından bunlara Dr hemaglütinin de denmektedir (2,7).

#### *Afimbrial Adezinler (AFA)*

İlk kez 1984 yılında *afa* gen demeti piyelonefritojenik *E. coli* suşlarının genomik DNA'sı üzerinde lokalize 6.7 kb bir fragman olarak tanımlanmıştır. Bu fragmanda 13, 30, 100, 18.5, 16 kDa'luk beş gen belirlenmiştir. Bunlar *afaA*, *afaB*, *afaC*, *afaD*, *afaE* olarak isimlendirilmiştir. Bunlardan yalnızca *afaB*, *afaC*, *afaE* mannoz rezistans hemaglütinasyon yapmakta ve üroepitelyal hücrelere yapışma özelliği göstermektedir. Ayrıca enteropatojenik *E. coli* suşlarında ve üropatojenik *E. coli* suşlarında gösterilmiş AIDA-I, CS6, M, NFA, CS31A gibi başka afimbrial adezinler de tanımlanmıştır (35).

#### *Sideroforlar*

Geçmiş birkaç yıl, bakteriyel virulans için olası spesifik faktörlerin tanımlanmasında major gelişmelere tanıklık etmiştir. Patojenik bakteri konak dokusuna girdikten sonra bağlanır, yeni çevrede çoğalır ve sonuçta belirgin bir hasar meydana getirir (3,26,36). Bakteriyel infeksiyon kompleks multifaktöryel bir prosestir (19). Bu olay bir taraftan konağın savunma mekanizmaları (infeksiyona yanıtta doğumsal veya kazanılmış) öte yandan patojenin konak dokuda yaşayabilmesi için gerekli mikrobiyal virulent determinantlar arasında dinamik bir yarışmayı içerir. Ayrıca konağa invaze olan bakteri infeksiyon odağında çoğalabilmek için besin elde etme gereksinimi duyar. İnfeksiyon oluşumunda demir önemli rol oynar (19).

Demir mikro-organizmalar için temel bir gelişme faktörüdür. Gerçekte laktik asit bakterileri dışında tüm biyolojik sistemler 0.4-4.0  $\mu$ M arasında demire gereksinim duyarlar. Demir; memelilerde peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz gibi oksijen metabolizması ile ilişkili ve mikrobiyal sistemlerdeki dioksijenaz, çeşitli acid hidroksilazlar, RNA polimeraz ve ribonükleotid redüktaz gibi enzimlerin temel kofaktörüdür. Demir aynı zamanda, elektron transferinde yer alan suksinat

dehidrogenaz ve ferridoksin, hidrojenaz ve sitokromlar için gereklidir. Vertebralılarda nötrofil fonksiyonları, T ve B lenfosit aktivitesi ve naturel killer hücre fonksiyonları tamamen demir bağımlıdır (19,22). Fizyolojik pH ve hidrofilik ortam FeIII'ün daha az çözünmesini sağlar. Sonuçta, serbest demir konsantrasyonu  $10^{-12}$   $\mu$ M gibi az miktarlara düşer. Mikroorganizmaların gereksinim duyduğu demir miktarı ise yaklaşık 5  $\mu$ M'dür (36).

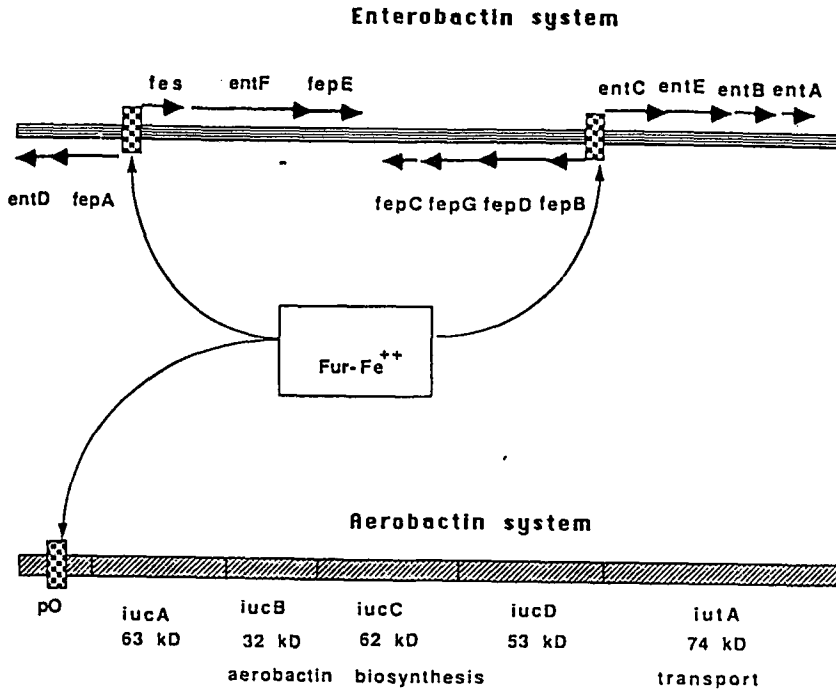
Demir biyokimyasal reaksiyonlarda ve oksijen taşınmasında gerekli olduğu için, canlı organizmalar demir kazanma, taşıma ve depolama için etkili sistemler geliştirmişlerdir (18,20,22,37).

İnsanlarda, transferrin ve laktoferrin ferrik demiri bağlama ve plazma ve sekresyonlarda taşınmasından sorumludur (20,26,38). Non-fonksiyone demir hücrelerde ferritin molekülü içinde ferrik oksohidroksi kristalleri olarak depolanır. Çoğu virulan mikroorganizma transferrin, laktoferrin, ovoferrin gibi proteinlerden demiri çıkarıp alma eğilimindedir. Bu durumda mikroorganizma proteinden demir elde etmek için demir bağlanma yerini değiştirir (26). Ayrıca bu güçlü demir koruyucu sistemler ile yarışmak için mikroorganizmalar sideroforlar denilen kendi şelate edici bileşiklerini geliştirmiştir (25,26,38).

Mikroorganizmalar tarafından üretilen demir şelatörleri olarak tanımlanan sideroforlar Yunan dilinde "demir taşıyan" anlamına gelmektedir (18,37). Bakterilerin demir elde etme yollarından en iyi araştırılmış olan sideroforlardır (22). Sideroforlar demir bağlamaya çok yüksek eğilim gösteren düşük mol ağırlıklı bileşiklerdir. Moleküler ağırlıkları 500-1000 dalton arasındadır. Genellikle büyüklükleri 1000 Da'dan küçüktür (18,22,39,40,41). Sideroforlar iki ana sınıfa ayrılırlar; fenolatlar (katekollar) ve hidroksamatlar. Bir çok enterik bakteri (Escherichia, Klebsiella, Salmonella, Shigella, Enterobakter) her iki tip sideroforu (fenolat siderofor enterobaktin ve hidroksamat siderofor aerobaktin) birlikte sentezlerler (36,42,43,44).

### *Aerobaktin*

Aerobaktin ilk kez *Aerobacter aerogenes*'den izole edilmiştir (22,25,39). İki mol N-asetil N-hidroksi-L-lizin ile distal karboksil grubunda sitrik asit ile kombine olduğu gösterilmiştir (22,45). 1979 yılında Williams *E. coli* klinik izolatlarında yeni bir demir alım sistemi bulunduğunu ve bunun katekol değil hidroksamat tip bir siderofor olduğunu ileri sürmüştür (46). Bu siderofor sonuçta aerobaktin olarak tanımlanmıştır. Aerobaktin demir sistemi orijinal olarak pColV-K30 plazmidinde bulunmuştur (24). İnvaziv *E. coli* K1, *S.flexneri* ve enteroinvaziv *E. coli* gibi patojenik bakterilerin kromozomlarında da bulunmuştur. Aerobaktin içeren klinik suşlarda aerobaktin genlerinin daima bir replikasyon bölgesine (RPI) komşu olduğu Crosa tarafından bulunmuştur (24,45). Bu bölge "replikasyon-virulans" bölgesi olarak adlandırılmıştır (24). PColV-K30 aerobaktin sistemi *E. coli* ve olasılıkla diğer bakterilerde tüm demir transport sistemlerinin universal regülatörü olan kromozomal *fur* geni yolu ile hücrenin demir durumu tarafından bir operon olarak düzenlenen beş gen içerir. Aerobaktin biyosentezi ile ilişkili pColV-K30 genleri *iucA*, *iucB*, *iucC* ve *iucD*'dir (22,24,46). Bu genler sırasıyla 63 kDa'luk sentetaz, 32 kDa'luk asetilaz, 62 kDa'luk sentetaz ve 53 kDa'luk oksijenazı kodlarlar (24,46).



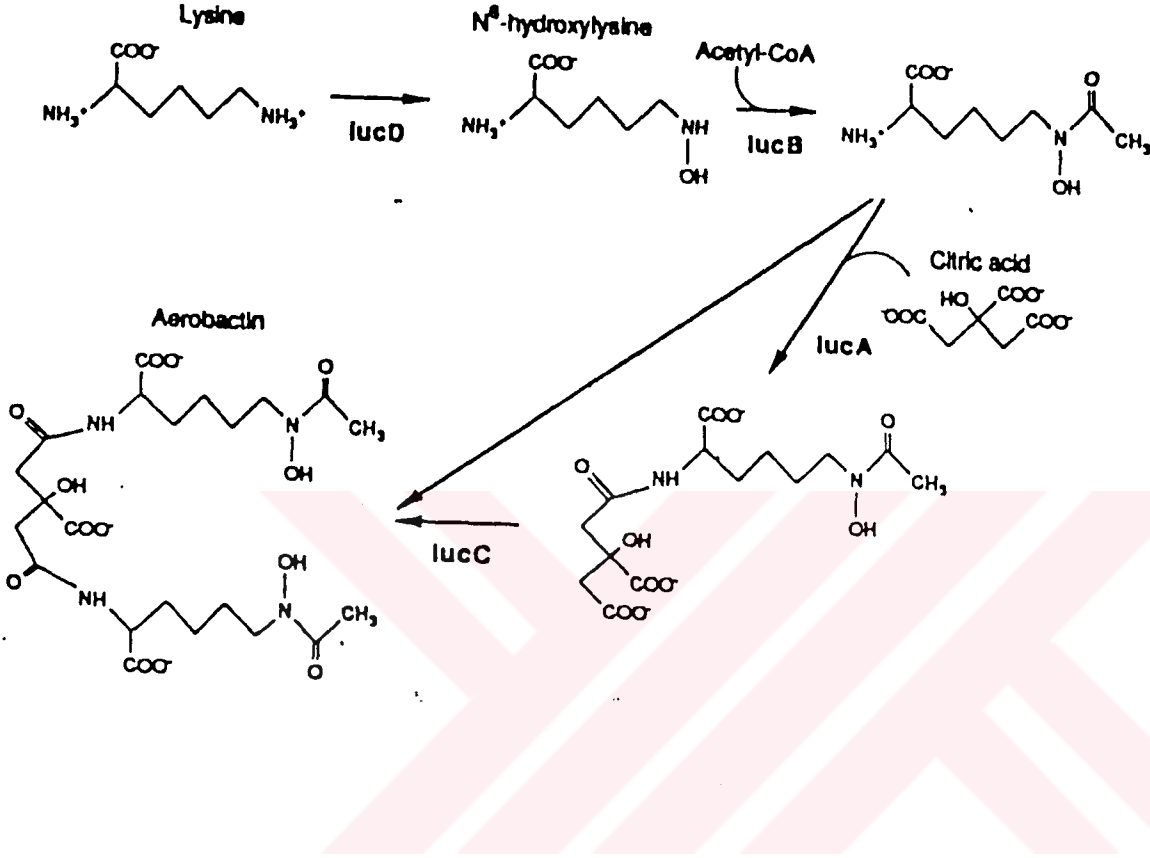
Şekil 1. Aerobaktin ve enterobaktin sistemi (24)

Ayrıca iutA geni aerobaktin için reseptör olarak etki eden 74 kDa'luk bir polipeptidi kodlar. Aerobaktin biyosentezi gerçekleşirken iuc genleri D→B→A→C sırasıyla görev yapmaktadırlar (Şekil 1,2). Biyosentez;

- Lizin hidroksilasyonunu hidroksil grubunun asetilasyonu ve ve hidroksamik asit oluşumu ve son olarak iki hidroksamik asit molekülünün sitrat ile birleşmesini izleyen bir sıra ile gerçekleşir (46).

Çalışmalar bu enzimlerin ilk basamağını kodlayan gen üzerine odaklanmıştır. Lizin hidroksilasyonu sırasında rol oynayan "lizin monooksijenaz" enzimi memeli hücrelerinde mevcut olmadığından aerobaktin sentezini bloke etmeyi amaçlayan kemoterapötik yaklaşımlarda bu basamak hedef olarak üzerinde düşünülen bir basamak olmuştur (18,46).

Aerobaktin üretimi hücre içi demir konsantrasyonuna bağlıdır (36). Fur proteini aerobaktin demir alım sisteminin operatörüne bağlanarak bir ko-faktör olarak Fe II'yi kullanan bir repressör olarak etki eder (22,39,45,46).



Şekil 2. Aerobaktin sentezi (21)

### *Enterobaktin*

Enterobaktin bir makrosiklik lakton halkasına bağlı üç dihidroksibezoilserin grubu içeren bir demir şelatördür. Benzer üç katekol grubu negatif yükü -3 olan heksadental demir merkezi oluşturarak delta-cis kompleksinde FeIII ile şelasyon oluşturur (22,47,48). *E. coli*, *S.typhimirium*, *K.pneumoniae* gibi Enterobactericeae türleri demir stresine yanıt olarak enterobaktin oluştururlar (36,48). Ferrik enterobaktin 81 kDa'luk dış membran proteini olan FebA'nın iki arjinin kalıntısına

bağlanır ve periplazmaya taşınır (48,49,50). Colicin B ve D de bu arjinin rezüdülerine bağlanır. Sitoplazmaya etkin demir enterobaktin taşınması bir soluble periplazmik protein olan FebB'yi gerektirir. FebB ferrik enterobaktini bağlar. E. coli hücre yüzeyinde oluşan LPP-OmpA-febB füzyon proteini ferrik sideroforları adsorbe eder ve FebB ferrik enterobaktini iç membran permeazı olan Feb CDG'ye transferini kolaylaştırır. Hücre içine taşınmanın bu son evresi ATP hidrolizini gerektirir. Demir bol olduğu zaman *fur* proteini ile ferröz kompleksi FebB'yi negatif olarak düzenler (49).

### *Lipopolisakkarid*

Gram negatif bakterilerin lipopolisakkaridleri (LPS) bakteriyel dış membranda yerleşmiş lipid A, bir core bölgesi ve tekrarlayan polisakkarid üniteleri içerir (2,5,9). LPS bakterinin dış yüzeyinin sınırını çizer polisakkaridlerin kaybı hidrofobisiteyi artırır, pürüzlü koloni morfolojisi ve tamponlarda otoaglutinasyona neden olur (11).

Bir çok düz bakteriye kıyasla, pürüzlü mutantlar komplemanla ilişkili lizise duyarlıdır. E. coli'nin klinik izolatları düz ve pürüzlü LPS fenotipleri arasındaki ara fenotipleri gösterir (11).

Lipid A parçacığı toksik, inflamatojenik ve immünomodulator özelliklere sahiptir. Gram negatif septiseminin birçok semptomu izole LPS veya Lipid A uygulanması ile oluşturulabilir. LPS CD14 reseptörleri olan belli konak hücrelerine bağlanır ve inflamatuvar yanıtı ortaya çıkarır (11).

### *Kapsuler Polisakkarid*

Kapsul polisakkaridler, fagositler ve komplemanın girişini kısıtlayarak S.pneumoniae, H.influenza ve N.meningitidis gibi bakteriler için klasik virulans faktörleridir (2,11). Aynı mekanizmaların üropatojenik E. coli'ye de uygulanabileceği varsayılabilir. E. coli suşlarındaki kapsuler polisakkarid K1 (CpsK1) alfa (2→8) N-asetilnöraminik asit kalıntılarından oluşmuş bir homopolimerdir (51).

Kapsüllü mutantlar invitro olarak fagosite direnç göstermede ve invivo böbreklerde kalmasında kapsülsüz mutantlar ile karşılaştırıldığında önemli avantajlara sahiptir (51,11). Kapsüler polisakkarid bakterinin kanda yaşaması için önemli bir virulans faktörü olarak saptanmıştır. Kapsüler polisakkarid zayıf immünojenik yapıdadır ve alternatif kompleman yolunun aktivasyonunu bozar ve bu bakterinin antikordan bağımsız serum bakterisidal aktivitesi ve opsonofagositoza karşı direncine katkıda bulunur (51).

### *Hemolizinler*

Hemolizinler eritrositi parçalama yeteneklerine göre sınıflandırılan sitotoksik proteinlerdir (2,3). Hemolizinler krozoal genlerin ürünleri olabilirler veya plazmidler tarafından kodlanırlar (11). Kromozomal veya ekstrakromozomal hemolizin genleri yüksek derecede homoloji gösterirler. E. coli O6K15'te hemolizin geni siyalik asit spesifik fimbriayı kodlayan genlere komşu 50Kb fragmanında lokalizedir. Hemolizin eritrosit dışında örneğin nötrofiller ve monositler gibi bir çok hücreye toksiktir. E. coli alfa hemolizini izole renal tübüler hücrelerde hasar yapar (11).

Bakteriler konak demirini elde edebilmek için alternatif bir yol olarak konak eritrositlerini parçalayarak salınan hemoglobinden hem demirini elde etmek için hemolizin ve proteazlar üretebilirler (26).

### *Serum Direnci*

İmmün olmayan serumların bakterisidal etkisi bakteriyel infeksiyonlara karşı konak savunmasında önemli rol oynar (52). Serumda bulunan komplemanın eritici etkisi ile bakteriler öldürülmektedir. Komplemanın aktivasyonu ile oluşan membran atak kompleks (MAK) bakteri hücre membranında porlar açarak hücrelerin lizisisine neden olur (3,13,14). Gram negatif bakterilerin fagosite direnç kapasitesi hücre yüzey kapsüler polisakkaritler veya proteinler veya lipopolisakkaritlerin O-antijenik yan zincirlerindeki özgül şekerlerin varlığı ile ilişkilidir (52). Serum direnci fenotipini kodlayan genler aerobaktin üretiminde olduğu gibi bazen plazmid DNA üzerinde

bulunurlar. Bu genlerin yokluğunda serum direnci ve aerobaktin üretimi azalacağından bakterinin patojenitesi azalacaktır (16).

### *İnaktif Serumda Üreme*

İnaktif insan serumunun da bakteriler için bakterisidal veya bakteriyostatik etkisi vardır. Serumda bulunan demir bağlayan proteinler bakterilerin demiri alıp kullanmasını azaltarak bakterisidal ve veya bakteriyostatik etki yapar. İnaktif serumda aerobaktin pozitif suşların aerobaktin negatif suşlara göre daha iyi çoğaldıkları gösterilmiştir (17).





## GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Mart 2000-Kasım 2000 tarihleri arasında idrar kültürü amacı ile gönderilen idrar örneklerinden etken olarak soyutlanan 124 E. coli suşu, aynı tarihlerde idrar dışında çeşitli klinik örnekten (kan, balgam, endotrakeal aspirasyon sıvısı, yara gibi) soyutlanmış 37 E. coli suşu ve sağlıklı bireylerin gaita örneklerinden normal flora elemanı olarak soyutlanmış 51 E. coli suşu çalışma kapsamına alındı. Çalışmaya alınan suşların soyutlandığı kişilere ait demografik bilgiler (hastanın adı soyadı, yaşı, cinsiyeti, örneğin kabul edildiği bölüm, ön tanı, antibiyotik kullanımı gibi) hazırlanmış olan forma kayıt edildi.

Suşların tanımlanması geleneksel yöntemler ile yapıldı. Suşlar şekerlere olan etki, H<sub>2</sub>S oluşturup oluşturmadığı, gaz oluşumu, üreaz aktivitesi, tek karbon kaynağı olarak sitrat kullanımı, triptofandan indol oluşumu, metil kırmızısı, Voges prouskauer (VP) testleri, hareket gibi biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanmıştır. Laktoz pozitif, gaz oluşturan, H<sub>2</sub>S oluşturmeyen, üre ve sitrat besiyerinde üremeyen, indol pozitif, metil kırmızısı pozitif, VP negatif suşlar E. coli olarak tanımlanmıştır (1,4,5). E. coli olarak tanımlanmış suşlar siderofor ve diğer virulans faktörlerinin araştırılması amacıyla nutrient agara pasajlanarak çalışma anına kadar derin dondurucuda saklandı.

### VİRULANS FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

#### *Hemaglutinasyon (HA) ve Mannoza Rezistans Hemaglutinasyon (MRHA)*

Bakterilerde fimbria tiplerinin saptanması amacı ile Puzova ve ark. yöntemi modifiye edilerek uygulandı (53).

O grubu insan kanı sodyum sitratlı tüpe alındı. Santrüfuj edildikten sonra plazma ayrıldı. Eritrositler fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) (pH 7.2) ile 3 kez yıkandı. Daha sonra PBS içinde %3 oranında eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Ayrıca %3 D-mannozlu ve D-mannozsuz PBS solüsyonları hazırlandı. %5 koyun kanlı agarda bir

gece inkübasyondan sonra elde edilmiş suşların taze kültürlerinden PBS içinde oldukça yoğun ( $10^{12}$  /ml) bakteri süspansiyonu hazırlandı.

Her suş için iki mikrolate kuyucuğu kullanılarak test uygulandı. Her suş için kuyucuklardan birine 100µl bakteri süspansiyonu, 100µl D-mannozsuz PBS ve 100µl %3 eritrosit süspansiyonu eklendi. Diğer kuyucuğa ise 100µl bakteri süspansiyonundan, 100µl, %3 D-mannozlu PBS ve 100µl %3 eritrosit süspansiyonundan ilave edildi. Mikrolate oda ısısında çalkalayıcıda (15 rpm) 5 dakika ve +4 derecede 15 dakika bekletildi. Hemagglütinasyon varlığı ve D-mannoz eklenmiş kuyucuklarda hemagglütinasyon inhibisyonu makroskopik olarak değerlendirildi. D-mannozsuz kuyucukta hemagglütinasyonun olması ve D-mannozlu kuyucuklarda hemagglütinasyonun inhibe olması o suşun MSHA içerdiği, hemagglütinasyonun devam etmesi MRHA içermesi şeklinde yorumlandı. Negatif kontrol olarak serum fizyolojik kullanıldı.

#### *Siderofor Üretimi*

Siderofor varlığı (aerobaktin ve enterobaktin) Rabsch ve Reissbrodt tarafından tanımlanan biyolojik yöntemle araştırıldı (54,55).

#### *Rabsch ve Reissbrodt'un Biyolojik Yöntemi:*

Bu yöntemde kullanılan mutant suşlar İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır.

#### *Aerobaktin Tip Siderofor Aranması*

Bu yöntemde indikatör olarak E. coli LG 1522 mutant suşu kullanılmıştır.

### *Tris- Succinate Besiyeri*

Succinic acid	2 g
Disodyum succinate	2 g
Distile su	200 ml

pH 7.4 ( 20 N NaOH ile ayarlandı)

### *Destekleyici solüsyon*

Coccarboxylase	2.0 mg
NAD	5.0 mg
Nicotinic acidamide	1.0 mg
Thiamin	2.5 mg
Distile su	10 ml

Filtrasyon ile sterilize edildi ve daha sonra  
200 ml tris-succinate besiyerine

Oxoid agar No 1	2.4 g
Casein hydrolysat	1.0 g
Bacto pepton	0.2 g

İlave edilerek 121 °C'de 20 dakika sterilize edildi ve 50 °C'ye soğutulduktan  
sonra aşağıdakiler ilave edildi.

$\alpha,\alpha$ Dipiridyl ( 5.4 mg/ml distile su )	1 ml
Nitritriasetat ( 3.8 mg/ml distile su )	1 ml
E. coli LG 1522 süspansiyonu ( 620 nm de 0.2 abs.)	3 ml
Destekleyici solüsyon	2 ml

Hazırlanan bu nutrient agar besi yeri petrilere döküldü.

### *Testin Uygulanması*

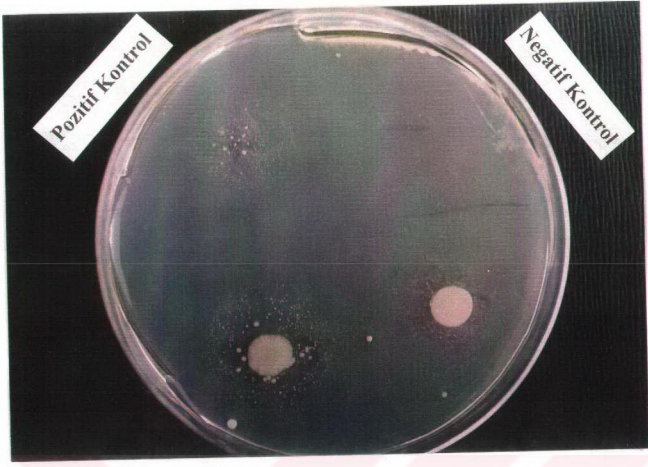
EMB besiyerinde üreyen test suşlarından 1 koloni alınarak ayrıca hazırlanmış  
olan 0.5 ml tris-succinate besiyeri içinde 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.

Starvasyon (açlık, yoksunlaştırma) sonrası tris-succinate besiyerinden 5µl bakteri süspansiyonu alınarak petrilerde hazırlanmış olan nutrient agar yüzeyine damlatıldı. Pozitif kontrol olarak 4 mM FeCl<sub>3</sub> süspansiyonundan ve negatif kontrol olarak E. coli LG 1522 mutant süspansiyonundan agar yüzeyine 0.05 ml damlatıldı. Damla kurduktan sonra 37 °C'de 18 saat inkübe edildi.

### *Değerlendirme*

Denenen bakteriye ait koloninin etrafında nutrient agara önceden eklenmiş olan E. coli LG 1522 mutant süşunun üremesi denenen bakterinin aerobaktin tip siderofor sentezlediğini gösteren bulgu olarak değerlendirildi (Resim 1,2).





Resim 1: Pozitif, negatif kontroller ve aerobaktin pozitif suşlar



Resim 2: Aerobaktin pozitif ve negatif suşlar

### *Enterobaktin Tip Siderofor Aranması*

Bu yöntemde indikatör olarak *S.typhimurium* enb-7 mutant suşu kullanılmıştır.

#### *I-Vogel – Bonner Besiyeri*

MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
Citric acid	2.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.0 g
NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub>	3.5 g
Distile su	1000 ml
pH 7.0 (5 N NaOH ile ayarlandı)	

#### *II- Destekleyici Solüsyon*

Coccarboxylase	2.0 mg
Glukoz	0.5 mg
NAD	5.0 mg
Nicotinic acidamide	1.0 mg
Distile su	10 ml
Filtrasyon ile sterilize edildi.	

#### *III- Nutrient agar*

200 ml Vogel Bonner besiyeri

Agar	2.4 g
Casein hydrolisate	1.0 g
Bacto-Pepton	0.2 g

121 °C'de 20 dakika sterilize edildi ve 50 °C'ye soğutulduktan sonra aşağıdakiler ilave edildi.

O-Phenanthroline ( 4.95 mg/5 ml distile su )	0.6 ml
<i>S. typhimurium</i> enb-7 süspansiyonu ( 620 nm'de 0.2 abs.)	3 ml
Destekleyici solüsyon	10 ml

#### *IV- Starvasyon (açlık, yoksunlaştırma ) için Nutrient Besiyeri*

Vogel-Bonner besiyeri %0.5 glukoz ile zenginleştirildi

Testin Uygulanması

#### *Denenecek suşların starvasyonu*

EMB besiyerinde 37 °C’de bir gece inkubasyonla üretilmiş olan suştan 1 koloni alınıp, 0.5 ml nutrient besiyerine ekildikten sonra 1 saat inkübe edildi.

#### *Biyolojik yöntemin uygulanması*

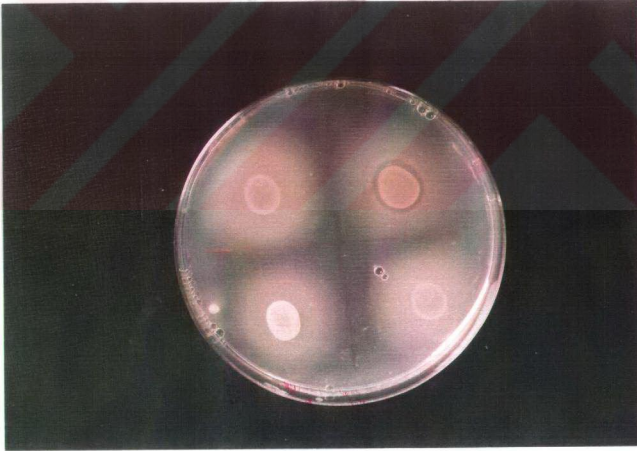
Starvasyondan sonra Nutrient besiyerinden 5 l bakteri süspansiyonu alınarak petrielerde hazırlanmış olan Nutrient agar besiyeri üzerine damlatıldı. Damla kuruduktan sonra 37 °C’de 18 saat inkübe edildi. Negatif kontrol olarak S. typhimurium enb-7 mutant suşu süspansiyonu, pozitif kontrol olarak 4 mM FeCl<sub>3</sub> solüsyonundan 5 l miktarında agar yüzeyine damlatıldı.

#### *Değerlendirme*

Denenen bakteriye ait koloninin çevresinde nutrient agara önceden eklenmiş olan S. typhimurium enb-7 mutant suşunun üremesi denenen bakterinin enterobaktin tip siderofor sentezlediğini gösteren bulgu olarak değerlendirildi (Resim 3,4).



Resim 3: Pozitif, negatif kontroller ve enterobaktin pozitif suşlar



Resim 4: Enterobaktin pozitif suşlar



### *Hemolizin Varlığı*

Suşların %5 koyun kanlı agarda oluşturdukları kolonileri değerlendirildi. Kolonilerin etrafındaki ve altındaki alanda besiyerinin şeffaflaşması hemolizin varlığı yönünden olumlu kabul edildi (56).

### *Serumun Bakterisidal Etkisine Direnç*

Serum bakterisidal aktivitesinin ölçümünde Puzova ve ark.'nın yöntemi kullanıldı (53).

%5 koyun kanlı agarda 37 °C'de bir gece inkübe edilmiş test edilecek E. coli suşlarının Hanks'in dengeli tuz solüsyonunda (HBSS)  $2.5 \times 10^4$  cfu/ml yoğunluğunda süspansiyonları hazırlandı. Sağlıklı bireylerden elde edilmiş O kan grubu serumlardan hazırlanmış serum havuzu kullanılabildiği kadar -70 °C'de saklandı. Mikroplate'in her kuyucuğuna test edilecek suşun hazırlanan süspansiyonundan 0.05 ml ve önceden elde edilmiş O kan grubu insan serumundan 0.05 ml serum pipetlendi. Tüm suşların bu karışımından 0. dakikada kanlı agara ekimleri yapıldı ve daha sonra mikroplate yüzeyi parafinle kapatılarak çalkalayıcıda 37 °C'de 180 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda yeniden test edilen suşlar mikroplate'den kanlı agara pasajlandı. 37°C'de bir gecelik inkübasyondan sonra değerlendirildi. Suşların kanlı agardaki üremeleri başlangıç değerinin %1'ine düşmüşse seruma duyarlı, 180 dakika sonunda bakterilerin %90'dan fazlası yaşıyorsa seruma dirençli olarak değerlendirildi.

### *İnaktif Serumda Üreyebilme Özelliği*

Sağlıklı kişilerden toplanan serum örnekleri kullanılıncaya kadar -70 °C'de saklandı. Kullanmadan önce 56°C'de 30 dakika inaktive edildi. İncelenecek E. coli suşlarının %5 koyun kanlı agardaki bir gecelik kolonilerinden toplanarak PBS içinde 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonları hazırlandı. Bu bakteri süspansiyonlarından inaktif serum içine ml'de  $10^3$  bakteri olacak şekilde eklendi. Serum 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 1/10, 1/100 ve 1/1000 oranında dilüsyonları yapılarak kanlı agar plaklarına 0.1 ml oranında ekimleri yapıldı. 37°C'de

24 saatlik inkübasyondan sonra koloni sayımı yapıldı. Bakteri sayısının %100 veya daha fazla artması pozitif sonuç olarak değerlendirildi (17,57).

#### ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

Antibiyotik duyarlılığının araştırılması Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi ile yapıldı (58). Kontrol suş olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık testlerinde ampisilin, amoksisilin-klavulonikisit, sefalotin, sefaklor, sefepim seftriakson, sefotaksim, siprofloksasin, gentamisin, imipenem, trimetoprim-sulfametaksazol antibiyotik diskleri kullanıldı. Sonuçlar NCCLS M2-A6 standartlarına göre yorumlandı (59).

#### DENEY HAYVANLARINDA PATOJENİTENİN ARAŞTIRILMASI

Sağlıklı, yaklaşık 30 gr ağırlığındaki *balbC* farelere siderofor pozitifliğine göre aşağıda belirtilen suşlar sırt bölgesinde cilt altına injekte edilerek cilt lezyonu oluşturuldu (60,61).

Gruplar siderofor özellikleri dışında diğer virulans özellikleri aynı olan suşlardan oluşturuldu. Tüm gruplarda hemolizin üretmeyen, MRHA yapan, serumun bakterisidal etkisine dirençli ve inaktif serumda üreme özelliği olan suşlar seçildi.

- 1- Sadece enterobaktin (Fenolat) tip siderofor içeren suş injekte edilen fareler (n=5)
- 2- Sadece aerobaktin (Hidroksamat) tip siderofor içeren suş injekte edilen fareler (n=5)
- 3- Hem enterobaktin hem aerobaktin tip siderofor içeren suş injekte edilen fareler (n=5)
- 4- Siderofor üretmeyen suş injekte edilen fareler (n=5)

Deney hayvanlarının traş edilmiş ve temizlenmiş deri bölgelerine 12 numaralı enjektörler ile denenecek bakteri süspansiyonundan deri altına 0.2 ml ( $10^8$  cfu/ml) injekte edildi. 24 saat sonra cilt lezyonu oluşturulan bölgeden doku örnekleri alınarak makroskopik olarak görülen abseler ve inflamasyon gözlenen doku alanı çıkarıldı ve tartıldıktan sonra steril havanlarda homojenize edildi. Homojenize edilen dokular 5

ml steril PBS ile sulandırıldıktan sonra 0.01 ml çaplı standart öze ile kanlı ve EMB agara ekimler yapıldı. 37 °C'de bir gecelik inkübasyondan sonra ml'de üreyen bakteri sayısı cfu/ml olarak hesaplandı ve 5 ml PBS ile sulandırıldığı için 5 ile çarpıldıktan sonra tartılan dokuların gram olarak ağırlığına bölünerek 1 gram dokudaki bakteri miktarı hesaplandı (60). Bu sonuçlar logaritma 10 tabanına çevrildi.

#### *İSTATİSTİKSEL YÖNTEM*

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 9.0 versiyonu kullanılarak ki kare ve hayvan deneyi sonuçlarının değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır.

## BULGULAR

Bu çalışmada çeşitli kliniklerden gönderilen idrar örneklerinden soyutlanan 124 üropatojen *E. coli* suşu, çeşitli örneklerden (yara, kan, balgam, endotrakeal aspirasyon sıvısı) etken olarak soyutlanan 37 *E. coli* suşu ve kontrol grubu olarak sağlıklı bireylerin gaitasından normal flora elemanı olarak soyutlanan 51 *E. coli* suşu çalışma kapsamına alınmıştır.

Çalışmaya alınan toplam 212 örneğin 140'ı kadın, 72'si erkek hastalardan soyutlanan suşlardır. Örneklerin 171'i (%80.7) ayaktan izlenen hastalardan, 41'i (%19.3) yatan hastalardan soyutlanmıştır. Çalışmaya alınan suşların cinsiyet, yaş, poliklinik/servis, örnek tipine göre dağılımı Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I: Çalışmaya alınan suşların cinsiyet, yaş, poliklinik/servis ve örnek tipine göre dağılımı

Örnek	Cinsiyet		Yaş		Poliklinik/Servis	
	K	E	0-16	17-85	P	S
İdrar	93	31	39	85	98	26
Diğer Örnekler.	18	19	9	28	22	15
Gaita	29	22	22	29	51	-
Toplam	140	72	70	152	171	41

Çalışma kapsamına alınan tüm hastaların son klinik tanılarına ulaşılamadığından klinik tanılarına göre değerlendirmeler yapılamamıştır.

### *I-Virulans Faktörleri*

Virulans faktörlerine göre suşlar değerlendirildiğinde, hemolizin üretimi kontrol olarak alınan gaita örneklerinden soyutlanan 51 *E. coli* suşunun 5'inde (%9.8); 124 idrar örneğinin 42'sinde (%33.9), 37 diğer örneklerin 13'ünde (%35.1) saptanmıştır ( $p=0.003$ ). Hemolizin üretimi bakımından idrar ve diğer örnekler arasında istatistiksel

olarak fark bulunmazken, idrar örneklerinin gaita örneklerinden daha fazla hemolizin ürettiği saptanmıştır ( $p = 0.001$ ). Aynı şekilde diğer örnekler ve gaita örnekleri arasında hemolizin üretimi bakımından fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p = 0.004$ ).

Hemolizin üretiminin örneklere göre dağılımı Tablo II’de gösterilmiştir.

Tablo II: Hemolizin üretiminin örneklere göre dağılımı

Örnek	Hemolizin var		Hemolizin yok		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
İdrar	42	33.9	82	66.1	124	100
Diğer	13	35.1	24	64.9	37	100
Gaita	5	9.8	46	90.2	51	100
Toplam	60	28.3	152	71.7	212	100

İncelenen 124 üropatojen *E. coli*, 37 diğer örneklerden soyutlanan ve 51 gaita örneklerinden soyutlanan normal flora elamanı *E. coli* suşunun hemagglütinasyon (HA) özellikleri Tablo III’te gösterilmiştir. İdrar örneklerinden soyutlanan *E. coli* suşların gaita örnekleri ile karşılaştırıldığında daha fazla hemagglütinasyon oluşturduğu görülmüştür ( $p= 0.011$ ).

Diğer örneklerde hemagglütinasyon oluşumu ile gaita örneklerinde hemagglütinasyon oluşumu arasında fark bulunmamıştır ( $p= 0.229$ ).

İdrar örnekleri ve diğer örneklerin hemagglütinasyon yapmaları bakımından arada fark bulunmamıştır ( $p= 0.439$ ).

Tablo III: Örneklerin hemaglutinasyon özellikleri

Örnek	Hemaglutinasyon var		Hemaglutinasyon yok		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
İdrar	104	83.9	20	16.1	124	100
Diğer	29	78.4	8	21.6	37	100
Gaita	34	66.7	17	33.3	51	100
Toplam	167	78.8	45	21.2	212	100

Mannoz rezistans hemaglutinasyon (MRHA) ve mannoz sensitif hemaglutinasyon (MSHA) oluşturma yönünden suşlar incelendiğinde idrar örneklerinin 70'i (%56.5), diğer örneklerin 20'si (%54.1) ve gaita örneklerinin 15'inde (%29.4) soyutlanan E. coli suşunun MRHA oluşturduğu bulunmuştur. İdrar örneklerinin 34'ü, diğer örneklerin 9'u ve gaita örneklerinin 19'u MSHA oluşturmuştur. MRHA ve MSHA oluşturma yönünden suşların karşılaştırılması Tablo IV'de verilmiştir.

Tablo IV: Suşların MRHA ve MSHA oluşturma özellikleri

Örnek	MRHA		MSHA		HA yok		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
İdrar	70	56.5	34	27.4	20	16.1	124	100
Diğer	20	54.1	9	24.3	8	21.6	37	100
Gaita	15	29.4	19	37.3	17	33.3	51	100

MRHA oluşturmaları bakımından örnekler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p= 0.04$ ).

İdrar örnekleri ile diğer örnekler arasında MRHA oluşturma bakımından fark bulunmazken, idrar örneklerinin gaita örneklerinden daha fazla MRHA oluşturduğu saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.001$ ).

Gaita ve diğer örnekler MRHA oluşturma özelliği açısından karşılaştırıldığında diğer örneklerin daha fazla MRHA oluşturdıkları saptanmıştır ( $p= 0.020$ ).

MSHA oluşturma özelliği bakımından örnekler arasında fark bulunamamıştır ( $p= 0.478$ ).

Örneklerin serumun bakterisidal aktivitesine karşı oluşturdıkları direnç incelendiğinde, idrar örneklerinin 77'sinin, diğer örneklerin 22'sinin ve gaita örneklerinin 34'ünün serum direncinin pozitif olduğu bulunmuştur. Örneklerin serum direnci özelliği bakımından aralarında fark saptanmamıştır ( $p= 0.768$ ).

Serum direnci özellikleri Tablo V'de gösterilmiştir.

Tablo V: Örneklerin serum direnci özellikleri

Örnek	Serum direnci var		Serum direnci yok		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
İdrar	77	62.1	47	37.9	124	100
Diğer	22	59.5	15	40.5	37	100
Gaita	34	66.7	17	33.3	51	100
Toplam	133	62.7	79	37.3	212	100

İnaktif serumda üreme özellikleri Tablo VI'da belirtilmiştir.

Tablo VI: Örneklerin inaktif serumda üreme özellikleri

Örnek	İnaktif Serumda		İnaktif Serumda		Toplam	
	üreme var		üreme yok		n	%
	n	%	n	%		
İdrar	108	87.1	16	12.9	124	100
Diğer	28	75.7	9	24.3	37	100
Gaita	47	92.2	4	7.8	51	100
Toplam	183	86.3	29	13.7	212	100

İnaktif serumda üreme özellikleri açısından örnekler karşılaştırıldıklarında idrar örnekleri ile diğer ve gaita örnekleri arasında fark bulunamazken ( $p=0.079$ ), diğer örnekler ile gaita örnekleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.031$ ).

Çalışma kapsamına alınan idrar örneklerinden soyutlanan 124, diğer örneklerden soyutlanan 37 ve kontrol grubu olarak fekal floradan soyutlanan 51 *E. coli* suşunda enterobaktin ve aerobaktin tip sideroforların varlığı Tablo VII'de gösterilmiştir.



Tablo VII: Üropatojen, diğ er örneklerden ve gaita örneklerinden soyutlanan E. coli suşlarında aerobaktin ve enterobaktin tip sideroforların varlığı

Örnek		Yalnız Aerobaktin Üreten	Yalnız Enterobaktin Üreten	Aerobaktin + Enterobaktin Üreten	Aerobaktin / Enterobaktin Üretmeyen	Toplam
İdrar	n	45	14	41	24	124
	%	36.3	11.3	33.1	19.4	100
Diğ er	n	15	8	11	3	37
	%	40.5	21.6	29.7	8.1	100
Gaita	n	3	14	18	16	51
	%	5.9	27.5	35.3	31.4	100
Toplam	n	63	36	70	43	212
	%	29.7	17.0	33.0	20.3	100

Siderofor üretimi yönünden çalışma kapsamına alınan suşlar incelendiğ inde idrar örneklerinin 86'sının (% 69.4), diğ er örneklerin 26'sının (% 70.3) ve kontrol grubu gaita örneklerinin 21'nin (% 41.2) aerobaktin ürettiğ i bulunmuştur. Örnekler arasında aerobaktin üretimi yönünden fark bulunmuştur (p= 0.001). İdrar ve diğ er örneklerin kontrol grubu gaita örneklerine göre daha fazla oranda aerobaktin ürettikleri saptanmıştır (sırasıyla p=0.001 ve p=0.007). İdrar örnekleri ve diğ er örnekler arasında aerobaktin üretimi açısından fark bulunamamıştır (p= 0.565).

İncelenen suşların bir grubunun sadece aerobaktin ürettikleri, bir grubunun aerobaktin ile birlikte enterobaktin ürettikleri ve bir grubunun sadece enterobaktin ürettikleri saptanmıştır. Ayrıca bir grup suşta ise araştırılan sideroforlardan herhangi birine rastlanmamıştır. İdrar kökenli ve diğ er kaynaklardan soyutlanan suşların ve kontrol grubu gaita örneklerinin sadece aerobaktin üretimine bakıldığında, idrar kökenli suşların 45'inin (%36.3), diğ er kaynaklı suşların 15'inin (%40.5) ve gaita kökenli suşları 3'nün (%5.9) sadece aerobaktin ürettikleri saptanmıştır.

Suşlar enterobaktin üretimi yönünden incelendiğinde idrar kaynaklı suşların 55'inin (%44.4), diğer kaynaklı suşların 19'unun (%51.4) ve kontrol grubu olan gaita kaynaklı suşların 32'sinin (%62.7) enterobaktin üretikleri saptanmıştır. Her üç örnek grubunda enterobaktin üretimi açısından istatistiksel olarak fark bulunmaz iken ( $p=0.085$ ); örnekler ikili olarak değerlendirildiklerinde idrar örneklerinin kontrol grubundan daha az enterobaktin ürettiği ve aradaki farkın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p=0.027$ ). Diğer kaynaklardan soyutlanan suşlar ile kontrol grubu suşlar enterobaktin üretimi yönünden karşılaştırıldığında arada fark bulunmamıştır ( $p=0.285$ ). Aynı şekilde idrar kökenli ve diğer kaynaklı suşlar da enterobaktin üretimi yönünden farklı bulunmamıştır ( $p=0.454$ ).

Örnekler sadece enterobaktin oluşturma yönünden değerlendirildiğinde, idrar kökenli suşların 14'ünün (%11.3), diğer kaynaklı suşların 8'inin (%21.6) ve gaita kökenli suşların 14'ünün (%27.5) sadece enterobaktin ürettikleri saptanmıştır.

Çalışma kapsamına alınan bazı suşların araştırılan sideroforlardan herhangi birini üretmedikleri bulunmuştur. İdrar kaynaklı örneklerin 24'ü (%19.4), diğer kaynaklı örneklerin 3'ü (%8.1) ve kontrol grubundan 16'sının (%31.4) herhangi bir siderofor üretmediği bulunmuştur.

Aerobaktin üretimi ile diğer virulans faktörlerinin ilişkisi Tablo VIII'de gösterilmiştir.

Tablo VIII: Aerobaktin üretimi ile diğer virulans faktörlerinin ilişkisi

Örnek Tipi	Aerobaktin	Hemolizin		MRHA		Serum		İnaktif Serum		Toplam	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
İdrar	Pozitif	28	32.6	49	57.0	55	64.0	75	87.2	86	100
	Negatif	14	36.8	21	55.3	22	57.9	33	86.8	38	100
Diğer	Pozitif	9	34.6	14	53.8	17	65.4	22	84.6	26	100
	Negatif	4	36.4	6	54.5	5	45.5	6	54.5	11	100
Gaita	Pozitif	1	4.8	6	28.6	18	85.7	19	90.5	21	100
	Negatif	4	13.3	9	30.0	16	53.3	28	93.3	30	100

İdrar kökenli suşlardan hemolizin üreten 42 suşun 28'nin (%66.7) aynı zamanda aerobaktin de ürettiği saptanmıştır. Aerobaktin üreten 86 idrar kaynaklı suşun 28'inin (%32.6) hemolizin ürettiği bulunmuştur. Her iki açıdan bakıldığında idrar örneklerinde hemolizin üretimi ile aerobaktin üreten ve üretmeyen suşlar arasında bir ilişki bulunmamıştır ( $p=0.642$ ).

Diğer kaynaklı suşlar incelendiğinde hemolizin üreten 13 suşun 9'u (%69.2) aynı zamanda aerobaktin de üretmiştir. Aerobaktin pozitif bulunan 26 diğer kaynaklı suşun 9'unda (%34.6) hemolizin üretimi pozitif bulunmuştur ( $p=0.919$ ).

Kontrol grubu gaita örneklerinin hemolizin oluşturan 5 suşunun 1'i (%20) aerobaktin üretmiştir ( $p=0.311$ ).

Grupların kendi içlerinde hemolizin üretimi ile aerobaktin üretimi arasında bir ilişki görülmemiş olmakla birlikte, kontrol grubuna göre diğer her iki grupta da hemolizin üreten suşlarda aerobaktin üretiminin eş zamanlı olarak daha fazla bulunduğu saptanmıştır.

Aerobaktin üretimi ile MRHA varlığı değerlendirildiğinde idrar kaynaklı suşlardan aerobaktin üretimi saptanmış 86 suşun 49'unun (%57.0) aynı zamanda MRHA yaptığı bulunmuştur. İdrar örneklerinden MRHA yapan 70 suşun 49'unun (%70) aynı zamanda aerobaktin ürettiği saptanmıştır. İdrar örneklerinden aerobaktin üreten ve üretmeyen suşlarda MRHA üretimi bakımından fark saptanmamıştır ( $p=0.859$ ).

Diğer kaynaklı suşlardan aerobaktin üreten 26 suşun 14'ü (%53.8) aynı zamanda MRHA oluştururken, kontrol grubu gaita kaynaklı suşlarda aerobaktin pozitif 21 suşun 6'sı (%28.6) MRHA oluşturduğu bulunmuştur. Kontrol grubuna göre aerobaktin üreten suşlarda aynı zamanda MRHA varlığı daha yüksek oranda bulunmuştur ( $p=0.036$ ).

Aerobaktin üretimi ile serum direnci karşılaştırıldığında idrar kaynaklı suşların aerobaktin üreten 86 suşun 55'inde (%64), diğer kaynaklı suşların 26'sının 17'sinde (%65.4) ve kontrol grubu suşların 21'nin 18'inde (%85.7) serum direnci pozitif bulunmuştur. Kontrol grubunda aerobaktin üretimi ile serum direncinin birlikteliği diğer suşlara göre daha yüksek bulunmuştur ( $p=0.035$ ).

Aerobaktin üretimi ile inaktif serumda üreme özelliği değerlendirildiğinde, idrar kaynaklı suşların aerobaktin üreten 86'sının 75'inde (%87.2), diğer kaynaklı suşların 26'sının 22'sinde (%84.6) ve kontrol grubu suşların 21'nin 19'unda (%90.5) inaktif serum direnci pozitif bulunmuştur. Gruplar arasında aerobaktin üretimi ile inaktif serum direncinin birlikte bulunuşu açısından fark görülmemiştir.

Aerobaktin üretimi ile yaş grupları arasındaki ilişki araştırıldığında, idrar örneklerinde aerobaktin pozitif bulunmuş 86 örneğin 29'u pediatrik, 57'si erişkin yaş grubundaki bireylerden soyutlanmıştır. Diğer kaynaklardan soyutlanan aerobaktin pozitif 26 suşun 7'si pediatrik, 19'u erişkin, kontrol grubu suşlardan aerobaktin pozitif 21 suşun 9'u pediatrik 12'si erişkin yaş grubundan bireylerden soyutlanmış

suşlardır. Yaş grupları arasında aerobaktin üretimi açısından fark bulunmamıştır ( $p=0.937$ ).

Hemolizin üreten idrar kaynaklı 42 suşun 29'unda, gaita kaynaklı 5 suşun 1'inde ve diğer kaynaklı 13 suşun 4'ünde MRHA pozitif bulunmuştur. İdrar kaynaklı suşlarda, hemolizin pozitif suşlarda, hemolizin negatif suşlara göre daha fazla MRHA olduğu ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p=0.04$ ). Kontrol grubu suşlarda bu ilişki saptanmamıştır.

Hemolizin üretimi ile MRHA varlığı birlikteliği Tablo IX'da verilmiştir.

Tablo IX: Hemolizin üretimi ile MRHA varlığı

Örnek Tipi	Hemolizin	MRHA Var		MRHA Yok		Toplam	
		n	%	n	%	n	%
İdrar	Pozitif	29	69.0	13	31.0	42	100
	Negatif	41	50.0	41	50.0	82	100
Diğer	Pozitif	4	30.8	9	69.2	13	100
	Negatif	16	66.7	8	33.3	24	100
Gaita	Pozitif	1	20.0	4	80.0	5	100
	Negatif	14	30.4	32	69.6	46	100

İdrar, diğer örnekler ve gaitadan soyutlanan E. coli suşlarının antibakteriyel maddelere dirençleri TabloX'da gösterilmiştir.

Tablo X: İdrar, diğer kaynaklı ve gaita örneklerinden soyutlanan E. coli suşlarında çeşitli antibakteriyel maddelere direnç

Antibiyotikler	Dirençli Suş Sayısı					
	İdrar (n=124)		Diğer (n=37)		Gaita (n=51)	
	n	%	n	%	n	%
Ampisilin	95	76.6	29	78.4	38	74.5
Amoksisilin-klavulonat	40	32.3	15	40.5	19	37.3
Sefalotin	53	42.7	17	45.9	21	41.2
Sefaklor	27	22.0	10	27.0	5	9.8
Trimetoprim-sulfametaksazol	66	53.2	13	35.1	18	35.3
Seftriakson	3	2.4	2	5.6	-	-
Sefotaksim	2	1.6	2	5.4	-	-
Sefepim	1	0.8	1	2.7	1	2.0
Gentamisin	13	10.5	4	11.1	5	9.8
Siprofloksasin	21	16.9	3	8.1	3	5.9
İmipenem	0	-	1	2.7	-	-

İdrar örneklerinin antimikrobiyal maddelere dirençleri incelendiğinde en yüksek oranda ampisiline %76.5 direnç saptanmıştır. Diğer kaynaklardan soyutlanan ve kontrol grubundaki suşlarda da ampisilin direnci sırasıyla %78.4 ve %74.5 olarak yüksek oranda bulunmuştur.

Trimetoprim-sulfametaksazol direnci ampisilinden sonra ikinci sırayı almaktadır. İdrar örneklerinden soyutlanan suşlarda %53.2, diğer kaynaklı suşlarda %35.1 ve kontrol grubu suşlarda %35.3 olarak bulunmuştur. Direnç gelişmiş antimikrobiyaller arasında sefalotin üçüncü sırada yer almaktadır. Sefalotin direnci sırasıyla %42.7, %45.9 ve %41.2 olarak saptanmıştır.

Bütün gruplarda en düşük direnç imipenem ve sefepimde saptanmıştır.

İdrar örneklerinde aerobaktin üreten suşlar ile aerobaktin üretmeyen suşlarda antimikrobiyal direnç araştırılmış aerobaktin üreten suşlarda direnç oranları

aerobaktin üretmeyen suşlara göre daha yüksek bulunmuş ancak iki grup arasında direnç oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ) (Tablo XI).

Tablo XI: İdrar örneklerinden soyutlanan 86 aerobaktin üreten ve 38 aerobaktin üretmeyen *E. coli* suşunda çeşitli antimikrobiyal maddelere direnç

Antibiyotikler	Dirençli Suş Sayısı			
	Aerobaktin üreten (n=86)		Aerobaktin üretmeyen (n=38)	
	n	%	n	%
Ampisilin	67	77.9	28	73.7
Amoksisilin-klavulonat	31	36	9	23.7
Sefalotin	41	47.7	12	31.6
Sefaklor	21	24.4	6	15.8
Trimetoprim-sulfametaksazol	49	57	17	44.7
Seftriakson	1	1.2	2	5.3
Sefotaksim	1	1.2	1	2.6
Sefepim	-	-	1	2.6
Gentamisin	11	12.8	2	5.3
Siprofloksasin	16	18.6	5	13.2
İmipenem	-	-	-	-

### *II-Deneysel cilt infeksiyonu Modeli*

Virulans özellikleri araştırılmış olan suşlardan siderofor üretimi dışında diğer tüm virulans özellikleri benzer olan gruplar oluşturulmuştur. Tüm gruplarda hemolizin üretimi olmayan, MRHA yapan, serum direnci bulunan ve inaktif serumda üreyen suşlar seçilmiştir.

Çıkarılan abselerin homojenizasyonundan yapılan ekimler sonucu üreyen E. coli miktarı cfu/gr olarak hesaplanmış ve on tabanlı logaritmik değerlere dönüştürülmüştür.

Grupların ortalama üreyen E. coli miktarları TabloXII'de gösterilmiştir

Tablo XII: Hayvan deneyinde oluşturulan gruplarda ortalama üreyen E. coli miktarı

Gruplar	n	Log <sub>10</sub> ortalama E. coli miktarı
EA (-)	5	3.04
A (+)	5	6.35
E (+)	5	4.51
EA (+)	5	5.87

EA (-)= Enterobaktin ve aerobaktin üretmeyen A (+)= Sadece aerobaktin üreten

E (+)= Sadece enterobaktin üreten EA (+)= Hem enterobaktin hem de aerobaktin üreten

Gruplarda üreyen E. coli miktarları açısından fark olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile araştırılmış ve gruplar arasında üreyen E. coli miktarı açısından fark anlamlı bulunmuştur (p=0.039).

Grupların istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo XIII'de belirtilmiştir.



Tablo XIII: Grupların istatistiksel değerlendirme sonuçları

Gruplar	Ortalama	Standart Hata	Ortanca	Minumum	Maksimum	Çeyreklik
EA (-)	3.04	1.25	4.52	0	5.48	5.34
A (+)	6.35	0.39	6.90	5.15	7.10	1.58
E (+)	4.51	1.17	5.39	0	6.80	3.84
EA (+)	5.87	0.31	5.69	5.33	7.10	1.03

EA (-)= Enterobaktin ve aerobaktin üretmeyen A (+)= Sadece aerobaktin üreten

E (+)= Sadece enterobaktin üreten EA (+)= Hem enterobaktin hemde aerobaktin üreten

Gruplar arası karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. A (+) grupta EA (-) gruba göre üreyen E. coli miktarı istatistiksel olarak daha fazla bulunmuştur (p= 0.028).

EA (-) grup ile E (+) grup karşılaştırılmış üreyen E. coli miktarı istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır (p=0.245).

EA (+) grupta üreyen E. coli miktarı EA (-) gruptan daha fazla bulunmuştur. Ardaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.021).

E (+) ve A (+) grup karşılaştırıldığında üreyen E. coli açısından fark bulunmamıştır (p= 0.07).

EA (+) grup ile A (+) ve E (+) gruplar karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Sırasıyla p= 0.599 ve p= 0.251).

## TARTIŞMA

İnsanlar için önemli bir fırsatçı patojen olan E. coli türleri, buldukları yerde uygun koşullar oluşması durumunda çeşitli sistemlere yerleşerek infeksiyon oluştururlar (2,3,6). Barsak infeksiyonları yanısıra konağın savunma mekanizmalarını geçerek barsak dışı infeksiyonlara da neden olmaktadır. İdrar yolu infeksiyonları E. coli suşlarının barsak dışında neden oldukları en önemli infeksiyonlardandır (3,62,63). Yapılan çalışmalarda Amerika'da yılda hastanelerde yatan 1 milyon insanın yatış nedeninin idrar yolu infeksiyonu olduğu ve bunların 250.000'nin komplike olmayan pyelonefrit olgusu olduğu bildirilmektedir (64). Üriner sistem infeksiyonlarının %80'den fazlasında etkenin üropatojen E. coli olduğu bildirilmiştir (1,3,65). Ülkemizde yapılan çalışmalarda da idrar yolu infeksiyonlarında en sık soyutlanan mikroorganizma E. coli'dir (57,66,67,68).

İdrar yolu infeksiyonlarının tüm yaş gruplarında görülebildiği, ancak görülme sıklığının yaş grupları ve cinsiyete göre değiştiği bildirilmiştir. Özellikle 10 yaşın altındaki kız çocuklarında ve 20-40 yaş arası kadınlarda daha fazla üriner infeksiyon görülmektedir (3). Ancak tüm yaş gruplarında en sık etken patojen E. coli olarak bildirilmiştir (11). Bu çalışmada 124 idrar kaynaklı suşun 93'ü (%75) kadın, 31'i (%25) erkek hastalardan soyutlanmıştır. İdrar kaynaklı suşların 39'u (%31.45) çocuk yaş grubundandır. İdrar yolu infeksiyonu etkeni olarak soyutlanan suşların çoğunun kadın hastalara ait olması diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (57,68,69).

Çalışma kapsamına alınan 124 idrar kaynaklı suşun 98'i (%79) ayaktan izlenen hastalardan 26'sı (%21) yatan hastalardan soyutlanmıştır.

Nozokomiyal infeksiyonların % 40'nı idrar yolu infeksiyonları oluşturmaktadır. Nozokomiyal idrar yolu infeksiyonlarında etken %38 E. coli olarak bildirilmiştir (70,71).

E. coli idrar yolu ve barsak infeksiyonları yanı sıra yara, pnömoni ve yeni doğanlarda menenjitlere neden olur. Özellikle gram negatif sepsise ve endotoksemiye bağlı şokta en sık karşılaşılan mikroorganizma E. coli'dir (1,6). Normal konakta gastrointestinal sistemde ve üriner sistemde virulan E. coli'ler ile infeksiyon gelişirken; konakta savunma sisteminde zayıflamanın olduğu durumlarda patojen olmayan gram negatif organizmalar ile vücudun çeşitli yerlerinde, özellikle akciğerde infeksiyon gelişebilmektedir. Solunum yolunda infeksiyona neden olan E. coli'ler ile ilgili henüz spesifik virulans faktörleri tanımlanmamıştır (72). Toplum kaynaklıdan çok nozokomiyal E. coli pnömonileri bildirilmiştir (72).

Nozokomiyal bakteriyemi etkeni olarak E. coli'nin ilk kez 1970'de bildirildiği belirtilmektedir (72). Çoğu E. coli noninvazivdir ve özellikle normal konakta portal dolaşım sisteminde normal olarak filtre edilir. Özellikle idrar akışının engellendiği idrar yolu infeksiyonları ile ilişkili olarak bakteriyemi gelişmektedir (72,73,74). Genellikle bakteriyemide primer odak ürogenital, GİS, solunum yolu, endotrakeal tüp ve intravenöz kateterdir (72). Nozokomiyal bakteriyemi etkeni olarak en sık KNS, S.aureus ve E. coli bildirilmiştir (71).

E. coli özellikle distal ekstremitelerinde vasküler komplikasyon gelişen diabet mellituslu hastalarda etken olarak soyutlanmıştır. Ayrıca E. coli septik artrit, endoftalmit, süpüratif tiroidit, intraabdominal abse, spontan bakteriyel peritonit, karaciğer absesi, beyin absesi, endokardit, osteomyelit, prostatit, sinüzit, septik tromboflebit gibi bir çok klinik tabloya neden olmaktadır (72).

Bu çalışmada ayrıca yara, balgam, Endotrakeal aspirasyon sıvısı ve kan gibi diğer kaynaklardan soyutlanmış 37 suş çalışma kapsamına alınmıştır. Bu suşların 16'sı yara örneklerinden, 9'u balgam örneklerinden, 4'ü endotrakeal aspirasyon sıvısından, 2'si kandan, 6'sı diğer kaynaklardan soyutlanmıştır. Diğer kaynaklı 37 suşun 18'i (%48.6) kadın ve 19'u (%51.4) erkek hastalara ait örneklerdendi. Diğer kaynaklı örneklerin 9'u çocuk yaş grubundandı.

Son yıllarda idrar yolu infeksiyonları patogeneğinde idrar osmolaritesi, pH'sı, idrar mukozasının bakterisidal aktivitesi, Tamm-Horsfall proteinleri, sekretuvar IgA, laktoferrin, mesane mukopolisakkaridi, sitokinler gibi konağa ait savunma mekanizmaları yanında bakteriyel virulans faktörlerinin de önemli rol oynadığı vurgulanmaktadır (75).

Demir mikroorganizmaların gelişimi için esansiyel bir elementtir. Aerobaktin ve enterobaktin mikroorganizmaların demir elde etmek için geliştirdikleri mekanizmalardandır. Aerobaktin plazmidlerle ilişkili bir virulans faktörüdür. Aerobaktin Fe III için enterobaktinden daha düşük afiniteye sahip olmasına rağmen serumda bakterilerin gelişimini sağlamada çok daha etkindir. Bu aerobaktin molekülünün fiziksel özelliklerine bağlıdır. Aerobaktin transport siklusunun her döngüsünde yeniden kullanılabilen bir şant molekülü iken, enterobaktin kompleksi hücreye demir sağladıktan sonra bir esteraz tarafından bölünür ve yıkım ürünü atılır. Ayrıca aerobaktin bakteriyel hücrelerin demir gereksinen proteinlerine hemen demir sağlar iken, enterobaktin sistemi demiri önce hücre içi bir depoya bırakır. Bu da aerobaktin sisteminin enterobaktinden daha etkili bir sistem olduğunu düşündürmektedir (36). Aerobaktinin genetik ve işlevsel olarak düzenlenmesi pColV-K30 ve pColV-K311'de kodlanmıştır (36). Aerobaktin determinantlarının plazmidlerle ilişkisi aerobaktin pozitif suşların %27'sinde gösterilmiştir (15).

Birçok gram negatif mikroorganizmada aerobaktin ve enterobaktin varlığı araştırılmıştır (42,43,44,73). Gram pozitif suşların da çeşitli sideroforlar sentezledikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (76,77,78,79).

Carbonetti ve ark. toplam 516 E. coli suşunda klonal hibridizasyon ve biyolojik yöntem ile aerobaktin araştırması yaptıkları çalışmalarında septisemili olguların %68.8, pyelonefritli olguların %74.6'sında, semptomatik ÜSi'li olguların %59.8 ve asemptomatik alt üriner infeksiyonlu olguların suşlarında %63.2 aerobaktin bulmuşlardır (80). Çocuk ve erişkin yaş grubunda yapılan bir çalışmada

nonobstürüktif pyelonefritli olgulardan soyutlanmış çocuklara ait suşlarda %73, erişkin suşlarında %70, sistitli olgulardan soyutlanmış çocuk suşlarında %54, erişkin suşlarında %30 aerobaktin varlığı gösterilmiştir (33).

Montgomerie ve ark. kan izolatlarında %75, asit izolatlarında %47, nörojenik mesaneli hastaların idrarlarından soyutlanmış *E. coli* suşlarında %38 ve fekal flora suşlarında %42 oranında aerobaktin bulmuşlardır (17). Nörojenik mesaneli çocuklardan soyutlanmış *E. coli* suşlarının klonal tiplerinde virulans faktörleri çalışılmış ve hiç birinde aerobaktin sentezinin bulunamadığı bildirilmiştir (81). Diğer bir çalışmada fekal floradan soyutlanmış *E. coli* suşlarında aerobaktin sentezi %34 olarak bulunmuştur (73). Fekal flora elamanı *E. coli*'ler ile idrar yolu infeksiyonundan soyutlanmış suşlarda aerobaktinin araştırıldığı bir çalışmada fekal flora üyesi suşlarda %5, idrar kaynaklı suşlarda %79 aerobaktin sentezi saptandığı bildirilmiştir (82).

Belli serotipdeki *E. coli* suşlarında aerobaktinin arandığı çalışmalar vardır (83,84). Toplam 47 O15:K52:H1 *E. coli* suşu ile yapılan bir çalışmada %94 aerobaktin sentezi saptandığı bildirilmiştir (83).

Erkek hastalardan soyutlanan suşlarda aerobaktin sentezi araştırılmış ve akut pyelonefritli hasta suşlarında %51, akut sistitli hasta suşlarında %43 aerobaktin bulunduğu bildirilmiştir (85).

Ülkemizde yapılan *E. coli* ile ilgili virulans faktörü çalışmalarında sideroforlarla ilgili henüz çok fazla çalışma yoktur. Erler'in üropatojen *E. coli* suşlarında sideroforları araştırdığı çalışması bu konuda yapılmış ilk çalışmadır (57). Erler bu çalışmada üropatojen suşlarda aerobaktin üretimini %68.5, fekal flora üyesi suşlarda %31.7 olarak bulmuştur. Shokouhizadeh çalışmasında pyelonefritli hastalardan soyutlanan suşlarda aerobaktin üretimini %64.3 olarak bulmuştur. Bu

oran çocuk hastalarda %83.3, sistitli olgularda %46.6 ve kontrol grubunda %43.3 olarak bulunmuştur (69).

Bu çalışmada aerobaktin üretimi idrar kaynaklı suşlarda, balgam, yara, kan gibi diğer örneklerde soyutlanmış suşlarda ve kontrol grubu olarak gaita örneklerinde araştırılmıştır. Aerobaktin üretimi idrar kaynaklı suşlarda %69.4, diğer kaynaklı suşlarda %70.3 ve kontrol grubunda %41.2 olarak bulunmuştur. Bu bulgular literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (17,33,80,82). Çalışma kapsamına alınan suşların bazılarının sadece aerobaktin üretirken, bazılarının aerobaktin yanında enterobaktin de sentezledikleri gözlenmiştir. Sadece aerobaktin üretiminin idrar kaynaklı suşlarda %36.3, diğer kaynaklı suşlarda %40.5 bulunduğu bu çalışmada kontrol grubu suşlarda %5.9 gibi oldukça düşük oranda bulunması aerobaktin üretiminin patojen suşlarda önemli olduğunu göstermektedir.

Aerobaktin sentezinin varlığı çeşitli yöntemlerle araştırılmaktadır. Bu yöntemler arasında universal kimyasal yöntem, Casky yöntemi, biyolojik yöntem ve koloni hibridizasyon yöntemi vardır (15,41,55). Çeşitli mikroorganizmalarda aerobaktin sentezinin karşılaştırmalı olarak araştırıldığı çalışmalar vardır (15,55). İdrar yolu kaynaklı 58 hastanın kan kültüründen izole edilmiş E. coli suşlarında yapılan bir çalışmada fenotip testi ile %78, koloni hibridizasyon testi ile %78, total DNA araştırılması ile %78 oranında aerobaktin sentezinin saptandığı bildirilmiştir (15). Orskov ve arkadaşları biyolojik yöntem ile koloni hibridizasyonunu karşılaştırmalı olarak çalışmışlar ve koloni hibridizasyonu ile biyolojik yöntemle negatif bulunan suşlarda aerobaktin sentezini göstermişlerdir (73).

Bu çalışmada biyolojik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde indikatör olarak mutant suşlar kullanılmaktadır. Bu amaçla aerobaktin için aerobaktin biyosentezi inhibe edilmiş ancak aerobaktin reseptörü taşıyan E. coli LG1522 mutanı, enterobaktin için fenolat tip siderofor sentezlemeyen ancak fenolat tip uptake sistemi olan S.typhimirium enb 7 mutanı kullanılmaktadır (55). Biyolojik yöntem

uygulanması kolay ve görsel olması nedeniyle kullanılabilir bir yöntem olarak değerlendirilmiştir. Bu yöntemin uygulanmasında çeşitli ajanlarla besiyerinde demirden kısıtlı ortamın sağlanmasına dikkat edilmelidir.

E. coli suşlarında aerobaktinin sistitli olgularda %40-60, pyelonefritli olgularda %70-75, ve kan izolatlarında %45-75, fekal flora üyesi suşlarda %34-71 arasında değişen oranlarda bulunduğu vurgulanmıştır (36). Çeşitli çalışmalar arasındaki bu farkın çalışılan yöntemden kaynaklanabileceği gibi bölgeler arası farklılıktan da kaynaklanabilir. Bu nedenle bu konuda epidemiyolojik çalışmaların önemli olduğu düşünülmektedir.

Enterobaktin diğer bir katekol siderofordur. Enterik bakterilerin katekol tip siderofor ürettikleri bilinmektedir (36). Enterobaktin sideroforların üriner infeksiyonlu hastalarda incelendiği çalışmalarda infeksiyon oluşumu ile enterobaktin üretimi arasında ilişki olmadığı gösterilmiştir (17).

Erlar yaptığı çalışmada enterobaktin üretimini idrar kaynaklı E. coli suşlarında %34.2 fekal flora üyesi E. coli suşlarında %36.3 olarak bildirmiştir (57). Ülkemizde ayrıca Salmonella suşlarında enterobaktin varlığının araştırıldığı çalışmalar vardır (42,43).

Bu çalışmada enterobaktin sentezi idrar kaynaklı suşlarda %44.4, diğer kaynaklı suşlarda % 51.3, kontrol grubu suşlarda %62.8 olarak bulunmuştur. Fekal flora üyesi suşların diğer suşlardan daha yüksek oranda enterobaktin ürettikleri bulunmuştur. Patojen olarak kabul edilmeyen normal flora üyesi suşlarda aerobaktin üretiminin enterobaktin üretiminden daha az bulunması anlamlı bulunmuştur. Bu çalışmada patojen olarak kabul edilen suşlarda aerobaktin üretimi enterobaktin üretiminden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Buna göre aerobaktin üretiminin gerek idrar infeksiyonlarında ve gerekse diğer infeksiyonlardan sorumlu E. coli suşlarında bir virulans özelliği olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Hemolizin diğerk virulans faktörlerinden biridir. E. coli hemolizini, ekstraintestinal ve ÜSİ ile ilişkili sitotoksinin RTX ailesinin üyesi olarak bilinir. Hemolizin sentezi 4 birleşik HlyCABD geni içeren operon tarafından yönlendirilir (3,86). Hemolizinin nefrotoksisite ve sitotoksisite ile ilişkili olduğu yapılan deneylerde gösterilmiştir. Aynı zamanda mikroorganizmaların gelişimi için gerekli olan demirin eritrositlerden salınımından da sorumlu olduğu bildirilmiştir (15). König ve ark yaptıkları çalışmada yüksek düzeyde lökotrien salınımı nedeniyle hemolizinin sadece hücrel bir toksin olmadığını ve aynı zamanda çeşitli hücrelerin bir aktivatörü olduğunu vurgulamışlardır (87). Johnson ve ark. 58 E. coli suşunda fenotip testi ile %45, kolon hibridizasyonu ile %47 ve total DNA ile %43 oranında hemolizin varlığı göstermişlerdir (15). Çocuklarda ve erişkinlerde yapılan çalışmalarda farklı klinik formlarda hemolizin araştırılmış, çocuklarda febril ÜSİ'de %63, asemptomatik bakteriüri (ABU)'da %27 oranında hemolizin saptanmıştır (88). Erişkinlerde yapılan bir çalışmada akut pyelonefritte %73, febril ÜSİ'de %76 ve akut sistitte %50 oranında hemolizin varlığı gösterilmiştir (85). Hemolizin ve diğerk virulans faktörlerinin araştırıldığı hayvan kökenli E. coli suşları üzerine çalışmalar da vardır (89).

Rhen ve ark. hemolitik aktiviteyi pyelonefritli suşlarda %60, sistitte %27 ve ABU'da %17 ve fekal florada %10 olarak bulmuşlardır (30 ). Diğerk bir çalışmada sırasıyla %54, %47, %17.8 ve %19.6 olarak bulunmuştur (73). Yapılan çeşitli çalışmalarda ÜSİ suşlarında hemolizin aktivitesi %26-62 arasında bulunmuştur (56,82,90). Akut prostatitli hastalardan soyutlanan suşlarda yapılan bir çalışmada fenotip olarak %58 ve genotip olarak %69 hemolizin saptanmıştır (91). Blanco ve ark. bakteriyemili hastalardan soyutlanan suşlarda %32 oranında hemolizin aktivitesi bildirmişlerdir (92). Ülkemizde yapılan çalışmalarda E. coli suşlarının hemolitik aktiviteleri araştırılmıştır. Coşar yaptığı çalışmada hemolizin üretimini %43 olarak saptamıştır (93). Ruhi ve ark. çocuk yaş grubunda farklı klinik tanılarına göre hemolizin aktivitesini araştırmış ve pyelonefritli olgularda %33, sistitli olgularda %31 ABU'lu olgularda %28, toplam olarak %21 oranında hemolizin aktivitesi saptamıştır.



Bu çalışmada kontrol grubunda hiç hemolizin aktivitesi saptanmamıştır (94). Shokouhizadeh yaptığı çalışmada farklı klinik formlardan izole idrar yolu infeksiyonu etkeni E. coli suşlarında %36.4, kontrol grubunda %46.7 oranında hemolizin aktivitesi bulmuştur (69). Abacıoğlu ve Yuluğ. kalsiyum iyonlarının varlığının hemolizin aktivasyonundaki rolünü incelemişler ve hemolizinin logaritmik üreme döneminde en fazla salgılandığını ve hemolitik suşların non hemolitik suşlara göre belirgin olarak hücre lizisine yol açtığını göstermiştir (95,96).

Alfa hemolizinin sitolitik fonksiyonu yanında yeni bir rolü tanımlanmıştır. Hemolizinin hedef hücrede ikinci mesajcı yanıtının oluşumunu indüklediği ve bu ikinci mesajcının inflamatuvar gen ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir (97). Bu çalışmada hemolizinin voltaj kapılı L tipi kalsiyum kanallarını ve inositoltrifosfat reseptörlerini aktive ederek kalsiyumda yavaş bir salınımına neden olduğu bulunmuş ve patojenik E. coli suşları bu yanıtı oluştururken, non patojenik suşların bu yanıtı oluşturmadıkları gösterilmiştir. Hemolizinin idrar yollarında idrarın akımı nedeniyle eritrositleri lizise uğratmaktan çok inflamasyonu indüklemek yolu ile etki ettiği belirtilmektedir (97).

Bu çalışmada idrar kaynaklı suşlarda %33.9 diğer kaynaklardan soyutlanan suşlarda %35.1 oranında hemolizin üretimi saptanmıştır. Bu iki grup arasında hemolizin üretimi yönünden fark bulunmazken, kontrol grubunda hemolizin üretimi (%9.8) bu her iki gruptan belirgin olarak düşük bulunmuştur. Bu çalışma ve diğer çalışmaların sonucu göstermektedir ki patojen suşlarda hemolizin bir virulans faktörü olarak rol almaktadır.

Piyelonefritojenik E. coli suşlarının kromozomal kodlanmış, P ve tip1 fimbria, hemolizin, O ve K serotipi ve aerobaktin gibi virulans faktörleri taşıdıkları ve özellikle son on yılda piyelonefritli erkek hastalar ve çocuklarda yapılan klinik ve deneysel olarak maymunlarda yapılan çalışmalarda P fimbriaların tek başına önemli olduğu belirtilmektedir. P fimbria reseptör dansitesi ile renal disfonksiyon arasında ilişki olduğu vurgulanmaktadır. Ayrıca E. coli suşlarının üroepitelial hücrelere

adhezyonu ile birlikte bazı sitokinlerin, özellikle IL-1, IL-6 ve IL-8'in salınımında artış olduğu belirtilmiştir (64,87). E. coli suşlarında ve diğer gram negatif bakterilerde bulunan tip1 fimbrialar filamentöz eklentilerdir. Saç benzeri bu yapılar belirli kan grubundan eritrositlerle aglütinasyon verdikleri ve bu aglütinasyonun mannozla önlediği bilinmektedir. Bu nedenle tip1 fimbrialar mannoz sensitif hemaglütinasyon (MSHA) yapan fimbrialar olarak isimlendirilirler. Çoğu E. coli suşunun tip 1 fimbria oluşturduğu gösterilmiştir. Hultgren ve ark. 54 E. coli izolatında %75 MSHA ve %32 MRHA saptarken, %14 oranında hiç hemaglütinasyon (HA) saptamamışlardır (31).

Hemaglütinasyon kapasitesinin araştırıldığı bir çalışmada 211 uropatojen suşun %80'inde ve fekal izolatların da %53'ünde herhangi bir tip hemaglütinasyon saptanmış ve idrar kaynaklı suşlarda %58, fekal izolatlarda %16 oranında MRHA bulmuşlardır (98).

Bu çalışmada idrar örneklerinden soyutlanan E. coli suşlarının %83.9'u, diğer kaynaklı örneklerin %78'i ve kontrol grubu gaita örneklerinden soyutlanan suşların %66.7'si herhangi bir tip hemaglütinasyon oluşturmuştur. MRHA yönünden örnekler incelendiğinde idrar kaynaklı suşların %56.5'i, Diğer kaynaklı suşların %54.1'i ve kontrol grubu suşların %29.4'ü MRHA oluşturmuştur. Hastalık etkeni olarak soyutlanan her iki gruptaki suşlar kontrol grubu suşlara göre anlamlı ölçüde daha fazla MRHA oluşturmuşlardır.

Fimbriaların araştırılmasında (hemaglütinasyon ve MRHA varlığı) lam aglütinasyonu, mikropate veya tüpte aglütinasyon gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin uygulanması sırasında bakterinin nutrient agar, CFA agar (colonization- factor antigen agar) veya %5 koyun kanlı agardaki kolonilerinin kullanıldığını bildiren çeşitli çalışmalar vardır. (53,57,91,93,98). Bu çalışmada hemaglütinasyon varlığını araştırmak amacıyla uygulanan yöntemde önerilen CFA agar temin edilemediğinden ve literatürde de %5 koyun kanlı agar kullanılarak hemaglütinasyon varlığının araştırıldığı çalışmaların bulunması

nedeniyle bakterilerin kanlı agardaki kolonileri kullanılarak yöntem uygulanmıştır (93,98).

Koloni hibridizasyonu, fenotip testi ve total DNA'nın ölçülmesi gibi karşılaştırmalı olarak fimbrialar araştırılmış ve 58 E. coli suşunun fenotip testi ile %88'i, koloni hibridizasyonu ile %98'i ve total DNA ile %98'i tip1 fimbria içerirken aynı suşların fenotip ile %62'sinin, koloni hibridizasyonu ile %74'ünün ve total DNA ile %76'sının P fimbria içerdikleri saptanmıştır (15).

Kateterle ilişkili bakteriüri hastalarda yapılan bir çalışmada kateter kullanımına göre hastalar gruplara ayrılmış ve kısa süreli kateter kullananlardan soyutlanan suşlarda %64, orta süreli kullananlarda %18 ve uzun süreli kateter kullananlarda %46 oranında MRHA bulunurken aynı çalışmada MSHA oranı sırasıyla %59, %65 ve %92 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada kateter uygulaması ile kalıcı E. coli infeksiyonu olduğu ve tip 1 fimbria ekspresyonunda artış olduğunun bulunduğu vurgulanmıştır (90). Ancak başka araştırmacılar kateterle ilişkili idrar yolu infeksiyonlarında fimbrialar dışında da adhezyonu etkileyen, flageller, yüzey zeta potansiyeli, hidrofobisite gibi hücre kompozisyonunun etkili olabileceğini belirtmişlerdir (99).

Bu çalışmada yatan hastaların bazılarında kateter olmasına karşın sayının grup oluşturacak kadar fazla olmaması nedeniyle kateter kullananlardan soyutlanan suşlar ile fimbria oluşumu arasındaki ilişki sorgulanmamıştır.

P ve tip 1 fenotipinin varlığının tek başına bakterinin idrar yoluna yerleşimi için yeterli olmadığı ve ABU suşlarının sistemik bir infeksiyona neden olmayıp sadece mukozal inflamatuvar yanıt oluşturacak kadar  $10^6$  düzeyinde üredikleri gösterilmiştir (63). Yapılan çalışmalar fimbriaların varlığının klinik tabloya göre farklılık gösterebildiğini ortaya koymuştur. Çocuklarda yapılan bir çalışmada febril üriner infeksiyonlu çocuklardan soyutlanan suşların %94'ünde ABU suşların %29'unda

aderans gösterilmiştir (88). Nörojenik mesaneli çocuklarda yapılan bir çalışmada bu çocuklardan soyutlanmış E. coli suşlarının klonal tiplerinde virulans faktörleri çalışılmış, tüm klonal tiplerde tip 1 fimbrialar bulunmuştur (81). Üriner yol infeksiyonlu erkek hastalarda yapılan bir çalışmada Akut piyelonefritte %56, febril ÜSİ de %45 ve akut sistitte %36 P fimbria varlığı gösterilmiştir. (85). Bir diğer çalışmada piyelonefritojenik suşlarda %87, sistitli suşlarda %35 ve fekal florada %22 MRHA bulunmuştur (30). Prostatitli olgulardan izole E. coli suşlarında %59 oranında pap pozitif bulunmuştur (91).

Ülkemizde üropatojen E. coli suşlarında virulans faktörleri ile ilgili çeşitli çalışmalar vardır (57,69,93,94). Shokouhizadeh yaptığı çalışmada piyelonefritli olgularda %35.7, sistitli olgularda %21.7 ABU'lu olgularda % 23.3 ve kontrol grubunda %10 oranında sadece MRHA saptamıştır (69). Bu gruplarda %56.6 ile 65 arasında hemaglutinasyon saptanmadığı bildirilmiştir. Coşar yaptığı çalışmada 130 üropatojenik E. coli suşunun %39'nun hemaglutinasyon oluşturduğunu bildirmiştir (93). Ruhi ve ark çocuk yaş grubunda yaptıkları çalışmalarında piyelonefritli olguların %81'inde sistitli olguların %58'inde ABÜ'lü olguların %47'sinde toplam tüm suşların %44'ünde MRHA pozitif bulmuştur (94). Hoşgör ve ark. 106 üropatojen E. coli suşunda yaptıkları çalışmada MRHA oranını %53 olarak saptamışlardır (100).

Bu çalışmada üropatojen suşlarda MRHA varlığı literetürdeki çalışmalar ve ülkemizde yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (15,92,94,100).

Yapılan çalışmalar gösteriyor ki, özellikle piyelonefritli olgularda daha fazla olmak üzere MRHA'ların varlığı klinik tablolara göre farklılık gösterebilmektedir (69,91). Bu çalışmada tüm hastalarda, özellikle ayaktan izlenen hastalarda son klinik tanıya ulaşamadığından klinik tabloya göre değerlendirme yapılamamıştır.

Belli bir serotip E. coli suşlarında yapılan bir çalışmada 117 O6 E. coli suşununun %98.3'ü tip1 fimbria içerirken, bu suşlarda %81.2 oranında MRHA

saptandığı bildirilmiştir (56). Karkainen ve ark. immün sistemi baskılanmış hastalarda %32 ve immün sistemi baskılanmamış hastalarda %55 oranında MRHA saptandığını bildirmişlerdir (101). Üropatojen E. coli'ler dışında diğer kaynaklardan izole E. coli suşları ile de çalışmalar vardır. Blanco ve ark. bakteriyemili hastalardan soyutlanan suşlarda yaptıkları bir çalışmalarında %25 P. fimbria saptadıklarını bildirirken diğer bir çalışmalarında P fimbria oluşumunu bakteriyemili hastalarda piyelonefritli hastalardan daha fazla oranda (%60-70) bulduklarını ve bu P fimbriaların da %86'sının MRHA tip IVa olduğunu vurgulamışlardır (74,92)

Bu çalışmada balgam, kan, yara gibi diğer kaynaklardan soyutlanmış E. coli suşlarında MRHA oluşumu %54.1 olarak saptanmıştır. Bu oran kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur.

Bu çalışmada ve literatürdeki çalışmalarda görülmektedir ki patojen olduğu düşünülen E. coli suşları fekal örneklerle göre daha yüksek oranda adherans faktörleri salgılamaktadırlar (94,98).

Gram negatif bakterilerin büyük çoğunluğu klasik veya alternatif kompleman yolu ile insan serumunda hızlı ve etkili bir şekilde öldürülür. Serumun bakteriyostatik aktivitesine dirençli suşlar da vardır (52). Serum direnci fenotipi plazmid DNA'sında bulunur (16). Jacobson ve ark. piyelonefritli çocuklardan soyutlanan suşlarda %93, erişkin suşlarında %82, bakteriyemili diyabetli hastalarda %80, diyabetli olmayan hastaların suşlarında %72, fekal suşlarda %57 oranında serum direnci bulduklarını bildirmişlerdir (52). ABU ve febril ÜSİ'li çocuklarda sırasıyla %68 ve %69 gibi benzer oranlarda serum direnci bildirilmiştir (88). Puzova ve ark piyelonefritli olgularda çocuklardan soyutlanan suşlarda %47, erişkinlerde %67, alt idrar yolu enfeksiyonlu çocuklardan soyutlanmış suşlarda %73 ve erişkinlerde %70 serum direnci bulmuşlardır (53). Yirmibeş nörojenik mesaneli çocuktan soyutlanmış 719 klonal E. coli suşunun hepsinde serum direnci pozitif bulunmuştur (81). ÜSİ'den soyutlanmış 100 ve fekal flora üyesi 20 suшта yapılan bir çalışmada serum direnci

sırasıyla %69 ve %65 olarak bildirilmiştir (82). Ruhi ve ark çalışmalarında ABU'li suşların %63'de ve kontrol suşlarının %43'de serum direncinin olduğunu göstermişlerdir (94).

Bu çalışmada idrar, diğer ve gaita kaynaklı suşlarda serum direnci sırasıyla %62.1, %59.5 ve %66.7 olarak bulunmuştur. Örnek grupları arasında serum direnci yönünden fark bulunamamıştır. Bu bulgular ışığında serum direncinin önemli olduğu ancak patojenitede belirleyici bir virulans faktörü olmadığı düşünülmüştür.

Montgomerie ve ark. aerobaktin pozitif bulunan kan örneklerin 6'sının 3'de 2 idrar örneğinin 2'sinde ve 8 gaita örneğinin 6'sında inaktif serumda üreme özelliğinin pozitif olarak bulduklarını bildirmişlerdir (17). Erler yaptığı çalışmada üropatojen E. coli suşların %58.3'ünde, aerobaktin sentezleyen suşların %90'unda, aerobaktin sentezlemeyen suşların %16.6'sında inaktif serumda üreme özelliği saptamıştır (57).

Bu çalışmada inaktif serumda üreme idrar kaynaklı suşlarda %87.1, diğer kaynaklı suşlarda %75.1 ve gaita kökenli suşlarda %92.2 olarak bulunmuş ve gruplar arasında fark bulunamamıştır.

ColV plazmidi üzerinde virulans ile ilişkili 3 genetik determinant bulunmuştur. Birincisi colisin yapımından sorumlu ve iss (increased survival in serum) genini taşıyan 5.3 kb fragmanlı ColV1-K94, ikincisi, invitro intestinal epitel adezyonundan sorumlu ColV-B188 plazmidi, ve üçüncüsü de demir taşınımı ile ilişkili bulunmuş olan ColV-K30 plazmididir (39). Aynı zamanda hemolizin üretiminin, P fimbriaların ve kromozomal aerobaktinin aynı genetik determinanatta olduğu bildirilmiştir (33,52). Bu bilgilerin ışığında aerobaktin varlığı ile diğer virulans faktörlerin birlikte bulunuşu bir çok çalışmada araştırma konusu olmuştur. Hemolizin üretimi ile aerobaktinin birlikteliği ile ilgili yapılan çalışmalarda ilişki bulunamamıştır (73). Johnson ve ark. aerobaktin pozitif suşlarda hemolizin varlığını %42, aerobaktin negatif suşlarda

hemolizin varlığını %46 olarak bildirmişlerdir (15). K1 E. coli suşlarında yapılan çalışmada hem aerobaktin ve hem de hemolizinin eş zamanlı olarak çalışılan suşların %12.5'de bulunduğunu, ancak hemolizin veya aerobaktin veya her ikisinin birlikte bulunmasının suşların %92.5'da bulunduğu gösterilmiştir (84). Diğer bir çalışmada 113 aerobaktin pozitif suşun 59'unda, aerobaktin negatif 58 suşun 22'sinde hemolizin pozitif bulunmuştur (73). Erler aerobaktin pozitif 30 suş ve aerobaktin negatif 30 E. coli suşunda aerobaktin üretimi ile hemolizin varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulamadığını bildirmiştir (57). Shokouhizadeh çalışmasında aerobaktin pozitif suşların %16.5'de aerobaktin negatif suşların %24.3'de hemolizini pozitif bulmuştur (69).

Bu çalışmada her bir örnek grubunda aerobaktin pozitif ve aerobaktin negatif suşlarda hemolizin üretimi arasında fark bulunamamıştır. İdrar örneklerinde aerobaktin pozitif suşlar ile hemolizin üretiminin bir arada bulunma sıklığı kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu da patojen suşlarda birden fazla virulans faktörünün bir arada daha fazla oranda bulunduğunu ve patojenliğin bir çok virulans özelliğinin bir arada bulunması durumunda sağlandığını düşündürmektedir. Hemolizin ve aerobaktinin aynı determinantta kodlanmış olmasına rağmen tüm suşların her iki virulans faktörünü bir arada bulundurmaması literatürdeki diğer çalışmalarda da vurgulanmıştır (73,84). Bu durumda hemolizin veya aerobaktin sentezini etkileyen başka faktörlerin olabildiği düşünülmüştür.

Aerobaktin sentezi ile MRHA sentezinin birlikte bulunma sıklığı bir çok çalışmada araştırılmıştır. Aerobaktin pozitif ve negatif suşlarda P fimbria varlığının sırasıyla %76 ve %77 gibi yakın oranlarda bulunduğunu bildiren çalışmalar yanında MRHA ve P fimbria ile aerobaktinin birlikte bulunuşunu anlamlı bulan çalışmalar da vardır (33,52,82). Erler aerobaktin sentezleyen suşlarda sentezlemeyen suşlara göre MRHA sentezi anlamlı olarak daha yüksek bulduklarını bildirmiştir (57).

Bu çalışmada tüm gruplarda aerobaktin üreten ve üretmeyen suşların MRHA sentezlemesi arasında fark bulunmazken kontrol grubunda aerobaktin pozitif suşlarda diğer gruplara göre anlamlı olarak daha az oranda MRHA sentezi saptanmıştır. Bu farkın gaita örneklerinde aerobaktin sentezleyen suşların sayısının az olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada idrar ve diğer kaynaklı suşlarda aerobaktin üretimi ile serum direnci arasında ilişki saptanmaz iken gaita örneklerinden aerobaktin pozitif suşlar negatif suşlara göre anlamlı ölçüde daha fazla serum direnci göstermişlerdir. İnaktif serumda üreme özelliği ile aerobaktin varlığı arasında ilişki saptanmamıştır.

Bu çalışmada hemolizin varlığı ile MRHA üretiminin aynı suшта birlikte bulunma sıklığı sorgulanmıştır. İdrar ve diğer kaynaklı örneklerde her iki virulans faktörünün birlikteliği anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubunda ise bu ilişki anlamlı bulunmamıştır. Hemolizin ve MRHA'nın beraber bulunmasını anlamlı bulan çalışmalar da vardır (82,94,101).

Bakterilerde çeşitli antibakteriyel maddelere karşı zaman içinde direnç gelişebilmektedir. Antibakteriyel maddelere karşı direnç çeşitli mekanizmalarla oluşmaktadır (102). Gram negatif bakterilerde de antibakteriyel maddelere karşı direnç gelişimi özellikle hastane kaynaklı infeksiyonlarda sorundur. Bu çalışmada çalışma kapsamına alınan tüm suşların çeşitli antibakteriyel maddelere karşı dirençleri araştırılmıştır. Tüm gruplarda ampisilin direnci yüksek oranda bulunmuştur. Yapılan çalışmalar bu sonucumuzu desteklemektedir (57,69,103). Antibakteriyel direnç plazmidleri taşıyan suşların aynı zamanda aerobaktin üretim determinantlarını da taşıdığı rapor edilmiştir. Bu ilişkinin antibakteriyel maddelere dirençte artış yapabileceği veya aerobaktinin virulansına katkıda bulunabileceği vurgulanmıştır (36). İdrar örnekleri sayı olarak en fazla aerobaktin pozitif suşlar olduğundan bu grupta aerobaktin üreten ve üretmeyen suşlar ile antibakteriyel maddelere direnç araştırılmış ve aerobaktin üreten ve üretmeyen grup arasında direnç



gelişimi bakımından hiçbir antibakteriyel maddede fark bulunmamıştır. Ülkemizde bu ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda da fark bulunmadığı bildirilmiştir (57,69).

Aerobaktin ve antibakteriyel maddelere direnç arasındaki ilişki araştırmaya açık bir konudur. Direnç mekanizmalarına ilişkin ileri çalışmalara gerek vardır. Sideroforların biyolojik aktif gruplarının antibakteriyel maddelerle kombinasyonunun tedavide yeni yaklaşımlar oluşturabileceği ileri sürülmüştür (22). Bu konuda yapılan çalışmalarda bir siderofor olan desferroksamin ve askorbik asitin birlikte kullanımının bakterilerin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (104). S.aureus üzerine sideroforların etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada desferroksamin ve askorbik asit varlığında sefalotinin, gentamisin, vankomisin, fusodik asit gibi antibakteriyel maddelerin sinerji gösterdikleri bildirilmiştir (105). İnvitro E. coli suşları üzerine sideroforlar ve antibakteriyel maddelerin etkisinin araştırıldığı çalışmada antibakteriyel maddelerin subinhibitör konsantrasyonlarında sinerji gözlemlendiği saptanmıştır (106). Sideroforlar ile vankomisin konjuge edilerek antibakteriyel aktivitesi araştırılmış ve ortamda demir düşük ise vankomisinin P.aeruginosa gibi gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu, ancak gram pozitif bakterilere karşı etkinliğin 4 ile 16 kat arasında azaldığı saptanmıştır (107). Onbir siderofor ve 21 antibakteriyel madde konjuge edilerek çeşitli bakteriler üzerine etki araştırılmış ve antibakteriyel maddelerin etki mekanizmalarına göre sideroforların etkisinin değiştiği bildirilmiştir. Betalaktamların açıl grubuna katekol parçasının eklenmesinin demir kısıtlı ortamlarda bu maddelerin antibakteriyel aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (27).

Bütün bu veriler ışığında sideroforlar ve antibakteriyel aktivite konusunun araştırılmasının tedavide yeni ufuklar yaratacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada sideroforların patojenitedeki rölü deneysel cilt infeksiyonu oluşturularak araştırılmıştır. Bakterilerin patojenliğinin araştırılmasında farelere intraperitoneal, cilt içi ve cilt altı bakterilerin belli miktarlardaki süspansiyonun uygulanması yöntemi kullanılmaktadır (60,61). Ayrıca direkt idrar yolu infeksiyonu da oluşturulabilmektedir. Bu çalışmada cilt altı uygulama kolay, pratik ve hızlı sonuç

alınabilmesi nedeniyle seçilmiştir. Literatürde aerobaktin sentezleyen ve sentezlemeyen suşlar ile çeşitli deneysel infeksiyon modellerinin oluşturulduğu çalışmaların varlığından söz edilmektedir (36). Aerobaktin pozitif suşlar ve aerobaktin negatif suşlarla yapılan renal infeksiyon modelinde aerobaktin pozitif gruptaki ölüm oranı aerobaktin negatif gruptan daha fazla bulunmuştur. Aerobaktin pozitif suşlarda ölümün erken geliştiği bunun olasılıkla bakteriyemi gelişimi sonucu olduğu vurgulanmıştır (17). Bakteriyemi gelişiminin aerobaktin pozitif suşlarda enterobaktin pozitif suşlardan daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Deneysel idrar yolu infeksiyonunda aerobaktin pozitif suşların aerobaktin negatif suşlardan daha fazla çoğaldıkları bunun idrardaki laktoferrini veya düşük demir düzeylerini yansıttığı düşünülmüştür (17). E. coli suşlarının farelerde öldürücülük düzeyleri LD50 ye göre gruplandırılmış, çok virulan grup olarak sınıflandırılan suşların avirulan olarak sınıflandırılan gruba göre sırasıyla %88 ve %24 belirgin olarak yüksek oranda aerobaktin oluşturdukları saptanmıştır (108).

Bu çalışmada gruplar oluşturulurken özellikle siderofor dışındaki diğer virulans özelliklerinin benzer olmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca aynı genetik determinant üzerinde bulunduğu belirtilen ve demir alımında etkili diğer bir mekanizma olan hemolizin üretiminin negatif olduğu suşlar özellikle seçilmiştir. Burada bakterilerin gelişiminde demir gereksiniminin rolü araştırılmak istenmiş ve bunun da sideroforlar yolu ile olduğunun gösterilmesi amaçlanmıştır. Deneysel cilt infeksiyonunda iki fare hariç tüm gruplardaki farelerde değişen büyüklükte abse ve inflamasyon alanı gözlenmiştir. Hiçbir siderofor içermeyen grup ile aerobaktin pozitif grup arasında üreme hızı bakımından anlamlı fark gözlenmiş buna karşın enterobaktin pozitif suşlar ile bu fark gözlenmemiştir. Hem enterobaktin hem de aerobaktin içeren grup ile hiç siderofor içermeyen grup arasında üreme bakımından fark anlamlı bulunmuştur. Sadece aerobaktin ve sadece enterobaktin pozitif gruplar karşılaştırıldığında aerobaktin pozitif grupta ortalama olarak daha fazla miktarda bakteri ürettiği ancak arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Ancak çalışılan

gruplardaki denek sayısının arttırılması durumunda aradaki farkın anlamlı olabileceği düşünölmüştür.

Bu bulgular ışığında bakterilerin gelişimi için gerekli olan demirin siderofor sistemleri aracılığı ile sağlanması önemli olduğu ve infeksiyon gelişiminde de etkili oldukları sonucuna varılmıştır. Bakterilerde virulansın bir çok faktöre bağlı olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Tanımlanan özellikler yanında henüz tanımlanmamış bir çok faktörün olduğu düşünölmektedir. Bütün bunlar bakterilerde yeni başka mekanizmaları da sorgulayan moleküler, epidemiyolojik çalışmaların olacağını tanımlanan her yeni virulans özelliğinin tedavide yeni yaklaşımlar için bir adım olabileceğini düşündürmektedir.



## SONUÇLAR

1- Çalışmaya alınan toplam 212 örneğin 140'ı kadın, 72'si erkek hastalardan soyutlanan suşlardır. Örneklerin 171'i (%80.7) ayaktan izlenen hastalardan, 41'i (%19.3) yatan hastalardan soyutlanmıştır.

2- Hemolizin üretimi 124 idrar örneğinin 42'sinde (%33.9), diğer örneklerin 13'ünde (%35.1) ve kontrol olarak alınan gaita örneklerinden soyutlanan 51 E. coli suşunun 5'inde (%9.8) saptanmıştır. Hemolizin üretimi bakımından örnekler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p=0.003$ ).

3- İdrar örneklerinin 70'i (%56.5), diğer örneklerin 20'si (%54.1) ve gaita örneklerinin 15'inde (%29.4) soyutlanan E. coli suşunun MRHA oluşturduğu bulunmuştur. Örneklerin MRHA oluşturmaları bakımından örnekler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p= 0.04$ ).

4- İdrar örneklerinin 77'sinin (%62.1), diğer örneklerin 22'sinin (%59.5) ve gaita örneklerinin 34'ünün (%66.7) serum direncinin pozitif olduğu bulunmuştur. Örneklerin serum direnci özelliği bakımından aralarında fark saptanmamıştır.

5- İnaktif serumda üreme özelliği bakımından örnekler arasında fark bulunamamıştır.

6- İdrar örneklerinin 86'sının (% 69.4), diğer örneklerin 26'sının (% 70.3) ve kontrol grubu gaita örneklerinin 21'nin (% 41.2) aerobaktin ürettiği bulunmuştur. Örnekler arasında aerobaktin üretimi yönünden fark anlamlı bulunmuştur ( $p=0.001$ ). İdrar ve diğer örneklerin kontrol grubu gaita örneklerine göre daha fazla oranda aerobaktin ürettikleri saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.001$  ve  $p=0.007$ ).

7- İdrar kaynaklı suşların 55'inin (%44.4), diğer kaynaklı suşların 19'unun (%51.4) ve kontrol grubu gaita kaynaklı suşların 32'sinin (%62.7) enterobaktin

üretikleri saptanmıştır. İdrar örneklerinin kontrol grubundan daha az enterobaktin ürettiği ve aradaki farkında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p=0.027$ ).

8- İdrar, diğer kaynaklı ve gaita kaynaklı, aerobaktin üreten ve aerobaktin üretmeyen suşlarda hemolizin üretimi açısından fark saptanmamıştır.

9- İdrar kaynaklı suşlardan aerobaktin üretimi saptanmış 86 suşun 49'unun (%57.0) aerobaktin üretmeyen 38 suşun 21'inde (%55.3) MRHA üretimi saptanmıştır fark anlamlı bulunmamıştır.

10- İdrar, diğer kaynaklı ve gaita kaynaklı aerobaktin üreten ve aerobaktin üretmeyen suşlarda serum direnci açısından fark saptanmamıştır.

11- Gruplar arasında aerobaktin üreten ve aerobaktin üretmeyen suşlarda inaktif serum direnci açısından fark görülmemiştir.

12- İdrar örneklerinde antibakteriyel maddelere en yüksek oranda direnç ampisiline %76.5 saptanmıştır. Diğer kaynaklardan soyutlanan ve kontrol grubundaki suşlarda da ampisilin direnci sırasıyla %78.4 ve %74.5 olarak bulunmuştur. Bütün gruplarda en düşük direnç imipenem ve sefepimde saptanmıştır.

13- İdrar örneklerinde aerobaktin üreten suşlarda direnç oranları aerobaktin üretmeyen suşlara göre daha yüksek bulunmuş ancak iki grup arasında direnç oranları istatistiksel olarak yorumlanmış, fark anlamlı bulunmamıştır.

14- Deneysel cilt modelinde gruplar arasında üreyen E. coli miktarı açısından fark anlamlı bulunmuştur ( $p=0.039$ ). Aerobaktin (A) (+) grupta enterobaktin-aerobaktin (EA) (-) gruba göre üreyen E. coli miktarı istatistiksel olarak daha fazla bulunmuştur ( $p= 0.028$ ). EA (-) grup ile enterobaktin (E) (+) grup karşılaştırılmış Üreyen E. coli miktarı istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. EA (+) grupta üreyen

E. coli miktarı EA (-) gruptan daha fazla bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.021$ ). E (+) ve A (+) grup karşılaştırıldığında üreyen E. coli açısından fark bulunmamıştır. EA (+) grup ile A (+) ve E (+) gruplar karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



## ÖZET

Bu çalışmada, idrar yolu ve diğer kaynaklardan ve gaitadan soyutlanan E.coli suşlarında siderofor ve diğer virulans faktörlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Antibakteriyel maddelere duyarlılığının test edilmesi ve sideroforların varlığı ile diğer virulans faktörleri ve antibakteriyel maddelere direnç arasındaki ilişki ve deneysel cilt infeksiyonu ile siderofor üretiminin patojenitedeki rolü araştırıldı.

E.coli suşlarının 124'ü idrar, 37'si diğer kaynaklardan ve 51'i gaitadan soyutlanmıştır. İdrar örneklerinin %69.4'ü, diğer örneklerin %70.3'ü ve kontrol grubu gaita örneklerinin %41.2'sinin aerobaktin ürettiği bulunmuştur. İdrar ve diğer örneklerin kontrol grubu gaita örneklerine göre daha fazla oranda aerobaktin ürettikleri saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.001$  ve  $p=0.007$ ). Enterobaktin üretimi ise, idrar kaynaklı suşlarda %44.4, diğer kaynaklı suşlarda %51.4 ve kontrol grubu olan gaita kaynaklı suşlarda %62.7 idi. İdrar örneklerinin kontrol grubundan daha az enterobaktin ürettiği bulunmuştur ( $p=0.027$ ). Hemolizin üretimi idrar örneklerinin %33.9, diğer örneklerin %35.1 ve gaita örneklerinin %9.8'inde saptanmıştır. İdrar örneklerinin %56.5, diğer örneklerin %54.1 ve gaita örneklerinin %29.4'ünde soyutlanan E.coli suşu MRHA oluşturmuştur. İdrar örneklerinin %62.1'nin, diğer örneklerin %59.5'nin ve gaita örneklerinin %66.7'sinin serum direncinin pozitif olduğu bulunmuştur. İdrar örneklerinde antibakteriyel maddelere en yüksek oranda direnç ampisiline %76.5 olarak saptanmıştır. Diğer kaynaklardan soyutlanan ve kontrol grubundaki suşlarda da ampisilin direnci sırasıyla %78.4 ve %74.5 olarak bulunmuştur. Bütün gruplarda en düşük direnç imipenem ve sefepimde saptanmıştır. İdrar örneklerinde aerobaktin üreten suşlarda direnç oranları aerobaktin üretmeyen suşlara göre daha yüksek bulunmuş ancak iki grup arasında direnç oranları istatistiksel olarak yorumlanmış fark anlamlı bulunmamıştır. Deneysel cilt infeksiyon modelinde, aerobaktin oluşturan grupta enterobaktin ve aerobaktin oluşturmayan gruba göre üreyen E.coli miktarı istatistiksel olarak daha fazla bulunmuştur ( $p=0.028$ ). Sonuç olarak, özellikle sideroforlar olmak üzere çeşitli virulans faktörlerin oluşturulması patojenitede önemlidir.

## SUMMARY

In the present study, it has aimed to investigate the production of siderophores and other virulence factors in *E. coli* strains, isolated from urine samples and the other infection sites, and from stool cultures. Antibacterial susceptibility and the correlation between virulence factors were investigated, and clarified the role of siderophores in pathogenicity with cutaneous infection model.

*E. coli* isolates was obtained from 124 urinary samples, 37 other samples and 51 faecal samples. It has found that the production of aerobactin was in 69.4%, 70.3% and 41.2% in urinary, in the other samples and in stool, respectively. The rates were higher in uriner and the other specimens than faecal specimen ( $p=0.001$  and  $p=0.007$ ). However, the production of enterobactin was in 44.4%, 51.4% and 62.7% in urinary, in the other samples and in stool, respectively. Enterobactin production in urinary samples was lesser than faecal samples ( $p=0.027$ ).

Production of haemolysin was found in 33.9%, 35.1% and 9.8% in the samples. The rate of MRHA was 56.5%, 54.1% and 29.4% in the *E. coli* strains isolated from urine, the other and faecal specimens. Serum resistance was positive in 62.1% urine samples, 59.5% the other samples and 66.7% faecal samples.

In urine specimen, ampicilline resistance was the highest (76.5%). The rates of the resistance were 78.4% and 74.5% in the strains from other samples and faecal samples. The lowest antibacterial resistance was found against imipenem and sefepim. The antibacterial resistance was higher, but not significantly, in the strains producing aerobactin.

The growing of *E. coli* was higher in aerobactin producing groups than non-aerobactin and non-enterobactin producing groups in cutaneous infection model ( $p=0.028$ ). As the result, production of various virulence factors, particularly siderophores is important in pathogenicity.



## KAYNAKLAR

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Enterobacteriaceae In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, eds. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1997: 171-252
2. Erdem B. Enterobacteriaceae. In: Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Tümbay, E, Mete Ö, eds. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 471-517.
3. Salyers AA, Whitt DD. Esherichia coli Urinary Tract Infections In: Salyers AA, Whitt DD, eds. Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach. Washington: ASM press, 1994: 205-212
4. Gray LD. Escherichia, Salmonella, Shigella and Yersinia In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology, 6<sup>th</sup> Edition, Washington DC: ASM Press, 1995: 450-456.
5. Bilgehan H. Enterobacteriaceae. In: Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. 10. Baskı, İzmir: Fakülteler Kitabevi, 2000: 1-16.
6. Crichton PB. Enterobacteriaceae. In: Colle JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, eds. Practical Medical Microbiology, 14<sup>th</sup> Edition. London: Churchill Livingstone, 1996: 361-384
7. Zwadyk P. Opportunistic Enterobacteriaceae In: Joklik WK, Willet HP, Amos BD, Wilfert CM, eds. Zinsser Microbiology 20<sup>th</sup> Edition. London: Prentice-Hall International Inc, 1992: 544-556.
8. China B, Goffaux F Secretion of virulence factors by Escherichia coli. Vet Res 1999; 30(2-3): 181-202.

9. Akan E. Enterobacteriaceae. In Akan E, Tibbi Mikrobiyoloji 2. Baskı, İzmir: Saray Tıp Kitabevi 1993: 70-80.
10. Eden CS. Bacterial adherence in urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Scand J Urol Nephrol* 1986; 20: 81-88.
11. Svanborg C, Godaly G. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11(3): 513-529
12. Tullus K, Jacobson SH, Katouli M, Brauner A. Relative importance of eight virulence characteristics of pyelonephritogenic *Escherichia coli* strains assessed by multivariate statistical analysis. *J Urol* 1991; 146: 1153-1155.
13. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: *Cellular and Molecular Immunology* 3<sup>th</sup> Philadelphia: WB Saunders, 1997: 313-338.
14. Roitt I, Brostoff J, Male D: *Immunology*. In : Roitt I. (ed) *Immunology* 4<sup>th</sup> London: Mosby Pub. 1993; 12.14-16.
15. Johnson JR, Moseley SL, Roberts PL, Stamm WE. Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. *Infect Immun* 1988; 56(2): 405-412.
16. Hirsh DC, Kirkham C, Wilson WD. Linkage of serum resistance, aerobactin production and resistance to antimicrobial agents on conjugal plasmids in some strains of *Escherichia coli* isolated from septic foals. *Am J Vet Res* 1993; 54(6): 878-881.
17. Montgomerie JZ, Bindereif A, Neilands JB, Kalmanson G, Guze LB. Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. *Infect Immun* 1984; 46(3): 835-838.
18. Neilands J B. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *Am Soc Biochem Mol Biol* .1995; 270 (45): 26723-26726

19. Wooldridge KG, Williams PH. Iron uptake mechanism of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 12: 325-348.
20. Erdem B. Bakterilerde sideroforlar ve diğ er demir alım sistemleri. *İnfeksi Derg* 1996; 10 (1) : 101-103.
21. Silver S, Walderhaug M. Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol Rev* 1992; 56: 195-228.
22. Neilands J B, Nakamura K. Regulation of iron assimilation in microorganisms. *Nutrition Rev* 1985; 43: 193-197
23. Weinberg ED. Iron, Infection and neoplasia. *Clin. Physiol. Biochem* 1986;4:50-60
24. Crosa JH. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev* 1989; 53(4): 517-530.
25. Neilands JB. Siderophores. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993; 302: 1-3.
26. Weinberg ED. Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Metabol Rev* 1990; 22(5): 531-579.
27. Diarra MS, Lavoie MC, Jacques M, Darwish I, Dolence EK, Dolence JA, Ghosh A, Ghosh M, Miller MJ, Malouin F. Species selectivity of new siderophore drug conjugates that use spesific iron uptake for entry into bacteria. *Antimicrobiol Agents Chemother* 1996; 40(11): 2610-2617
28. Sobel JD, Kaye D .Urinary tract infection. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R (eds), *Principles and practice of Infectious Diseases* 5<sup>th</sup> ed Churchill Livingstone, New York 2000: 773-805

29. Smyth CJ, Marron MB, Twohig JM, Smith SG. Fimbrial adhesins: similarities and variations in structure and biogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996 ;16(2): 127-139.
30. Vaisanen-Rhen V, Elo J, Vaisanen E, Shtonen A, Orskov I, Orskov F, Svenson SB, Makela PH, Korhonen TK. P-Fimbriated clones among uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* 1984; 43(1): 149-155.
31. Hultgren SJ, Schwan WR, , Schaeffer AJ, Duncan JL Regulation of production of type 1 pili among urinary tract isolates of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1986; 54(3):613-620.
32. Prescott LM, Harley PJ, Klein DA. Prokaryotic cell Structure and Function. In. Prescott LM, Harley PJ, Klein DA. (eds) *Microbiology* 4<sup>th</sup> eds New York: McGraw-Hill Companies. 1999: 37-66.
33. Jacobson SH , Hammarlind M, Lidfeldt KJ, Österberg E, Tullus K, Brauner A. Incidence of aerobactin-positive *Escherichia coli* strains in patients with symptomatic urinary tract infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1988; 7(5): 630-634.
34. Kuehn MJ, Heuser J, Normark S, Hultgren SJ. P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature* 1992; 356(6366): 252-255.
35. Le Bouguenec C, Bertin Y. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet Res* 1999; 30(2-3): 317-342.
36. De Lorenzo V, Martinez JL. Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7(5): 621-629.
37. Guerinot ML. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 743-772.
38. Hershko C, Peto TEA, Weatherall DJ. Iron and infection. *Br Med J* 1988; 296: 660-664.

39. Bindereif A, Neilands JB. Aerobactin genes in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1985; 161(2): 727-735.
40. Neilands JB. Effects of iron deprivation on outer membrane protein expression. *Methods in Enzymology* 1994; 235: 344-353.
41. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 1987; 160: 47-56
42. Erdem B, Erler F, Gerçeker D, Gökçen S, Aysev D, Yavuzdemir Ş. Değişik kaynaklı *Salmonella* suşlarında fenolat ve hidroksamat tipi siderofor sentezi. *İnfeksiyon Dergisi* 1995; 9(1-2): 75-78.
43. Erdem B, Erler F. İnsan kaynaklı salmonella suşlarında fenolat tipi siderofor sentezi. *Microbiyol Bülteni* 1995; 27: 7-13.
44. Podschun R, Sieveres D, Fischer A, Ullmann U. Serotypes hemagglutinins, siderophore synthesis and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. *J Infect Dis* 1993; 168: 1415-1421.
45. Crosa JH. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61: 319-336.
46. Bagg A, Neilands JB. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev* 1987; 51(4): 509-518.
47. O'Brien LG, Gibson F. The structure of enterochelin and related 2,3 dihydroxyl-N benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1970; 215: 393-402.
48. Thulasiraman D, Newton SMC, Xu J, Raymond KN, Mai C, Hall A, Montague MA, Klebba PE. Selectivity of ferric enterobactin binding and cooperativity of transport in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1998; 180 (24): 6689-6696.

49. Sprenkel C, Cao Z, Qi Z, Scott DC, Montague MA, Inanoff N, Xu J, Raymond KM, Newton SMC, Klebba PE. Binding of ferric enterobactin by the *Escherichia coli* periplasmic protein FebB. *J Bacteriol* 2000; 182(19): 5359-5364.
50. Larsen RA, Hartnett DF, McIntosh MA, Postle K. Regions of *Escherichia coli* TonB and FebA proteins essential for in vitro physical interactions. *J Bacteriol* 1997; 179(40): 3213-3221.
51. Colino J, Outschoorn I. The form variation of the capsular polysaccharide K1 is not a critical virulence factor of *Escherichia coli* in a neonatal mouse model of infection. *Microb Pathog* 1999 ; 27(4): 187-196.
52. Jacobson SH, Östenson CG, Tullus K, Brauner A. Serum resistance in *Escherichia coli* strains causing acute pyelonephritis and bacteraemia. *APMIS* 1992; 100; 147-153.
53. Puzova H, Siegfried L, Kmetova M, Filka J, Takacova V, Durovicova J. Fimbriation, surface hydrophobicity and serum resistance in uropathogenic strains of *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994; 9(3): 223-229.
54. Rabsch W, Reissbrodt R. Biotest zum Nachweis von hydroxamat-Fe-chelatoren (Aerobactin). *J Basic Microbiol* 1985; 25: 663-667.
55. Rabsch W, Reissbrodt R: Investigations of *Salmonella* strains from different clinical-epidemiological origin with phenolate and hydroxamate (aerobactin) siderophore bioassays. *J Hygiene Epiderm Microbiol Immun* 1988; 32: 353-360.
56. Zingler G, Schmidt G, Orskov I, Orskov F, Falkenhagen U, Naumann G. K-Antigen identification, hemolysin production and hemagglutination types of *Escherichia coli* O6 strains isolated from patients with urinary tract infections. *Zbl Bakt* 1990; 274: 372-381.

57. Erler F. Çocukluk çağı üriner sistem infeksiyonu etkeni olan E. Coli suşlarında siderofor varlığının araştırılması ve diğer virulans özellikleri ile ilişkisinin incelenmesi. Uzmanlık tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Ankara. 1995.
58. Janet H. Antimicrobial susceptibility testing. In: Isenberg HD eds. Essential procedures for clinical Microbiology . Washington DC: ASM, 1998: 205-216.
59. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performans Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 6. Baskı Approved standard M2-A6, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, 1998.
60. Bilgehan H. Laboratuvar deney hayvanları ve deney teknikleri In: Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 9. Baskı, İzmir: Fakülteler Kitabevi, 1995: 289-305.
61. Anđ Ö, Kuçuker M, Küçükbaşmacı Ö, Tekin M, Büyükbaba Boral Ö. Klebsiella Suşları ile Deneysel Deri Lezyonu Oluşturulması. KLİMİK 99 Kongre kitabından 3-8 Ekim Antalya 1999: 128.
62. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 9<sup>th</sup> ed. The Mosby Co, London 1994: 362 -385
63. Andersson P, Engberg I, Lidin-Janson G, Lincoln K, Hull R, Hull S, Svanborg C. Persistence of Escherichia coli bacteriuria is not determined by bacterial adherence. Infect Immun 1991; 59(9): 2915-2921.
64. Roberts JA. Management of pyelonephritis and upper urinary tract infections. Urol Clin North Am 1999; 26(4): 753-763.
65. Landraoud L, Gauthier M, Fosse T, Boquet P. Frequency of Escherichia coli strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. Lett Appl Microbiol 2000; 30: 213-216.

66. Acar NS, Kuzucu Ç, Kabakçioğlu M, Üstün C. Üriner sistem enfeksiyonlarında mikrobiyolojik değerlendirme ve mikroorganizmaların dağılımının irdelenmesi. Mikrobiyol Bült 1999; 33(2): 119-126.
67. Ayata A, Yorgancıgil MA, Öktem F, Çetin H, Örmeci AR. Çocukluk çağı idrar yolu enfeksiyonlarından elde edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılığı. İnfek Derg 1998; 12(1): 9-13.
68. Akbaş E, Zarakolu P, Aktepe OC, Tuncer A, Akbayrak H, Altınyollar H. İdrar yolu enfeksiyonu ön tanısı ile başvuran olgularda idrar örneklerinin mikrobiyolojik olarak değerlendirilmesi: İki yıllık bir çalışma. Mikrobiyol Bült 1997; 31(4): 351-362.
69. Shokouhizadeh S. Üropatojen Escherichia coli suşlarında virulans faktörlerinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. İstanbul, 1996.
70. Hierholzer J W, Zervos M . Nosocomial Bacterial Infection. In: Evans SA, Bracham PS (eds). Bacterial Infections of Humans 2<sup>th</sup> eds, New York and London : Plenum Medical Book Company 1991 : 467-498.
71. Prescott LM, Harley PJ, Klein DA. Microbial Diseases and Their Control. In: Prescott LM, Harley PJ, Klein DA. (eds) Microbiology 4<sup>th</sup> eds New York: McGraw-Hill Companies. 1999: 722-735.
72. Einsenstein BI, Zalezniak DF. Enterobacteriaceae. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R (eds), Principles and practice of Infectious Diseases 5<sup>th</sup> ed Churchill Livingstone, New York 2000: 2294-2310
73. Orskov I, Eden CS, Orskov F. Aerobactin production of serotyped Escherichia coli from urinary tract infections. Med Microbiol Immun 1988; 177: 9-14.



74. Blanco J, Alonso MP, Blanco M, Blanco JE, Gonzales EA, Garabel JJ. Establishment of three categories of P-fimbriated *Escherichia coli* strains that show different toxic phenotypes and belong to particular O serogroups. *FEMS* 1992; 99: 131-136.
75. Sobel JD. Pathogenesis of urinary tract infection: Role of host defenses. *Infect Dis Clin N Am* 1997; 11(3): 531-549.
76. Courcol RJ, Trivier D, Bissinger MC, Martin GR, Brown RWM. Siderophore production by *Staphylococcus aureus* and identification of regulated proteins. *Infect Immun* 1997; 65: 1944-1947.
77. Lisiecki P, Tkacz B, Sobis M, Mikucki J. The occurrence of siderophores in staphylococci. *Acta Microbiologica Polonica* 1994; 43(1): 21-31.
78. Modun B, Evans RW, Joanou EC, Williams P. Receptor mediated recognition and uptake of iron from human transferrin by *Staphylococcus aureus* and *epidermidis*. *Infect Immun* 1998; 66: 3591-3596.
79. Rapp SK, Jung G, Meiwes J, Zahner H. Staphloferrin A: a structurally new siderophore from staphylococci. *Eur J Biochem* 1990; 191: 65-74.
80. Carbonetti NH, Boonchal S, Parry SH, Vaisanen-Rhen V, Korhonen TK, Williams PH. Aerobactin-mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolates from human extraintestinal infections. *Infect Immun* 1986; 51(3): 966-968.
81. Schlager TA, Whittam TS, Hendley JO, Wilson RA, Bhang J, Grady R, Stapleton A. Expression of virulence factors among *Escherichia coli* isolated from the periurethra and urine of children with neurogenic bladder on intermittent catheterization. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(1): 37-41.
82. Vidotto MC, Furlaneto MC, Perugini MRE. Virulence factors of *Escherichia coli* in urinary isolates. *Brazilian J Med Biol Res* 1991; 24: 365-373.

83. Prats G, Navarro F, Mirelis B, Dalmau D, Margall N, Coll P, Stell A, Johnson JR. *Escherichia coli* serotype O15:K52:H1 as a uropathogenic clone. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1): 201-209.
84. Valvano MA, Silver RP, Crosa JH. Occurrence of chromosome- or plasmid-mediated aerobactin iron transport systems and hemolysin production among clonal groups of human invasive strains of *Escherichia coli* K1. *Infect Immun* 1986; 52(1): 192-199.
85. Ulleryd P, Lincoln K, Scheutz F, Sandberg T. Virulence characteristics of *Escherichia coli* in relation to host response in men with symptomatic urinary tract infection. *Clin Infect Dis* 1994; 18(4): 579-584.
86. Harel J, Martin C. Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res* 1999; 30(2-3): 131-155.
87. König W, König B, Hacker JF, Goebel W. Role of cloned virulence factors (mannose-related haemagglutination, mannose-resistant adhesins) from uropathogenic *Escherichia coli* strains in the release of inflammatory mediators from neutrophils and mast cells. *Immunology* 1989; 67: 401-407.
88. Marild S, Wettergren B, Hellström M, Jodal U, Lincoln K, Orskov L, Orskov F, Eden CS. Bacterial virulence and inflammatory response in infants with febrile urinary tract infection or screening bacteriuria. *J Pediatr* 1988; 112: 348-354.
89. Senior DF, deMan P, Svanborg C. Serotype, hemolysin production, and adherence characteristics of strains of *Escherichia coli* causing urinary tract infection in dogs. *Am J Vet Res* 1992; 53(4): 494-498.
90. Mobley HLT, Chippendale GR, Tenney JH, Hull RA, Warren JW. Expression of type 1 fimbriae may be required for persistence of *Escherichia coli* in the catheterized urinary tract. *J Clin Microbiol* 1987; 25(12): 2253-2257.

91. Mitsumori K, Terai A, Yamamoto S, Ishitoya S, Yoshida O. Virulence characteristics of *Escherichia coli* in acute bacterial prostatitis. *J Infect Dis* 1999; 180(4): 1378-1381.
92. Blanco J, Alonso MP, Gonzales EA, Blanco M, Garabal JI. Virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotising factor (CNF) by P-fimbriate strains. *J Med Microbiol* 1990; 31: 175-183.
93. Cosar G. Antibiotic susceptibility, hemolysin production and haemagglutinating activity of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1991; 35(3): 303-307.
94. Ruhi ZM, Özenci H, Ataoğlu H, Aysev D. Üriner sistem infeksiyonu bulunan çocukların idrarlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının virulans faktörleri ve antibiyotik duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg* 2000; 30(3-4): 85-92.
95. Abacioglu H, Yulug N. *Escherichia coli* hemolysin: sekresyon kinetik ve sitotoksik etkileri. *Mikrobiyol Bul* 1993; 27(4): 284-293.
96. Abacioglu H, Yulug N. Kalsiyum iyonlarının *Escherichia coli* hemolizin aktivasyonundaki yeri. *Mikrobiyol Bul* 1993; 27(4): 203-210.
97. Uhlen P, Laestadius A, Jahnukainen T, Soderblom T, Backhed F, Celsi G, Brismar H, Normark S, Aperia A, Richter-Dahlfors A. Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca<sup>2+</sup> oscillations in renal epithelial cells. *Nature* 2000; 405(6787): 694-697.
98. Gander RM, Thomas VL, Forland M. Mannose-resistant hemagglutination and P receptor recognition of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from adult patients. *J Infect Dis* 1985; 151(3): 508-513.

99. Reid G, van der Mei HC, Tieszer C, Busscher HJ. Uropathogenic *Escherichia coli* adhere to urinary catheters without using fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 16(3-4): 159-162.
100. Hoşgör M, Coşar G, Ermertcan Ş, Çarıkcı AY. Üropatojen *Escherichia coli* kökenlerinin bazı virulans özellikleri. *İnfeksiyon Derg* 2000; 14(2): 225-228.
101. Karkkainen UM, Ikaheimo R, Katila ML, Sivonen A, Siitonen A. Low virulence of *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in renal disease patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 254-259.
102. Gür D. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. eds. *İnfeksiyon Hastalıkları kitabında, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1996: 183-190.*
103. Durupınar B, Özkuyumcu C. İdrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen gram negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bült* 1988; 22(4): 332-328.
104. Hartzen HS, Moller FN, Thomsen VF. The antibacterial activity of a siderophore. *APMIS* 97 1989; 419-424.
105. Hartzen HS, Moller FN, Thomsen VF. The antibacterial activity of a siderophore. *APMIS* 99 1991; 879-886.
106. Hartzen HS, Moller FN, Thomsen VF. The antibacterial activity of a siderophore. *APMIS* 102 1994; 219-226.
107. Ghosh M, Miller MJ. Synthesis and in vitro antibacterial activity of spermidin based mixed catechol and hydroxamate containing siderophore-vancomycin conjugates. *Bioorganic Medicinal Chem* 1996; 4: 43-48.

108. Ou Said AM, Contrepois MG, Der Vartanian M, Girardeau JP. Virulence factors and markers in *Escherichia coli* from calves with bacteremia. *Am J Vet Res* 1988; 49(10): 1657-1660.



## **EKLER**

**Ek-1:** Hastaların demografik bilgileri ve çalışma kapsamına alınan suşların özelliklerinin kaydedildiği çalışma formu



Protokol No:

Hasta Ad Soyadı:

Yaş:

Cinsiyet: K E

Bölüm: Üroloji Pediatri KHD Diğer

Poliklinik

Yatan Hasta

Örnek İdrar Gaita Yara Diğer

Üreyen Mikroorganizma:

SUŞUN ÖZELLİKLERİ

Hemolizin

Var

Yok

MRHA

Var

Yok

Serum Direnci

Var

Yok

İnaktif Serumda Üreme

Var

Yok

Siderofor Varlığı

Fenolat ( Enterobaktin)

Hidroksamat (Aerobaktin)

Yok

Antibiyotik Duyarlılığı

AK	D	R	CİP	D	R	CEC	D	R	CAZ	D	R
AMP	D	R	SXT	D	R	KF	D	R	E	D	R
AMC	D	R	İMP	D	R	CRO	D	R	TE	D	R
SAM	D	R	P	D	R	CTX	D	R	GN	D	R