

Siprofloksasinin sub-minimal inhibitör konsantrasyonlarının *Escherichia coli* suşlarının hemagglutinasyon özellikleri üzerine etkisinin araştırılması (*)

Investigation of the effect of subminimal inhibitory concentrations of ciprofloxacin on the haemagglutination properties of Escherichia coli strains

Melek Demir, Nural Cevahir, İlknur Kaleli

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Denizli

İletişim / Correspondence: Melek Demir Adres / Address: Siteler M Barbaros C, Yenibahçelievler Sitesi C1 Blok No: 3 Kınıklı 20100/Denizli Tel: 258 295 24 82 Fax: 258 294 24 33 E-mail: mdemir@pau.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada siprofloksasinin subminimal inhibitör konsantrasyonlarının (sub-MİK) üropatojenik *Escherichia coli* (*E.coli*) suşlarının hemagglutinasyon (HA) ve mannoza dirençli hemagglutinasyon (MRHA) özellikleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada dört *E.coli* suşu incelenmiştir. İncelenen tüm *E.coli* suşlarında HA varlığı siprofloksasinin 1/2-1/16xMİK konsantrasyonlarında pozitif olarak saptanmıştır. MRHA özelliği iki suşta 1/2xMİK'de (+), diğer konsantrasyonlarda (+++) ve diğer iki suşta tüm sub-MİK'lerde (+++) olarak değerlendirilmiştir. Sonuçta, çalışmaya dahil edilen tüm *E.coli* suşlarında siprofloksasinin sub-MİK'lerinde HA ve MRHA özelliklerinin etkilenmediği görülmüştür.

Anahtar sözcükler: *E.coli*, MRHA, siprofloksasin, sub-MİK

SUMMARY

In this study, it was investigated the effect of subminimal inhibitory concentrations (sub-MIC) of ciprofloxacin on the haemagglutination (HA) and mannose-resistant haemagglutination (MRHA) properties of uropathogenic *Escherichia coli* (*E.coli*) strains. Four *E.coli* strains were included in this study. In 1/2-1/16xMICs of ciprofloxacin, HA properties of *E.coli* were found positive. In two strains, MRHA properties were found (+) positive in 1/2xMIC and (+++) positive in the other sub-MICs. In other two strains MRHA was found (+++) positive in all sub-MICs. It was concluded that HA and MRHA properties were continued in sub-MICs of ciprofloxacin in all *E.coli* strains included this study.

Key words: *E.coli*, MRHA, ciprofloxacin, sub-MIC

GİRİŞ

İdrar yolu infeksiyonları bakteriyel infeksiyonlar arasında en sık rastlanılanıdır. *Escherichia coli* (*E.coli*) üriner infeksiyon etkenleri arasında gerek ayaktan gerekse yatan hastalarda en sık soyutlanan mikroorganizmadır(1-3). *E.coli* suşları fimbriyal yapılar, hücre yüzey hidrofobisitesi, hemolizin, siderofor gibi çeşitli virulans faktörleri ile infeksiyon oluşturur. Birçok infeksiyonun başlangıcında gerekli olan mikroorganizmanın konak hücreye tutunmasıdır. Diğer birçok virulans faktörü yanında fimbriyal yapılar idrar yolu epiteline tutunma ve burada kolonize olup infeksiyon yap-

ma özellikleri nedeniyle önemlidir. *E.coli* suşlarında mannoza duyarlı (MSHA) ve mannoza dirençli hemagglutinasyon (MRHA) yapan fimbriyalar gösterilmiştir (2). MRHA yapan fimbriyal yapılardan en önemli olanı P fimbriyalardır. Antibakteriyel maddelerin etkililiğini, ilaç konsantrasyonu, ilacın farmakodinamik özellikleri, konağın özellikleri ve bakteriye ait virulans özellikleri belirlemektedir (4-7). Antibakteriyel maddelerin sub-minimal inhibitor konsantrasyonları (sub-MİK) bakterilerin üremelerinin durdurulması üzerine etkileri olmayan ancak halen bakterilerin çeşitli biyokimyasal ve yüzey yapıları üzerine etkilerinin olduğu konsantrasyon olarak tanımlanmak-

(*) Bu çalışma XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (12-16 Eylül 2006 Antalya) sunulmuştur.

tadır. Antibiyotiklerin sub-MİK'lerinin bakterilerin yüzeye tutunmalarında rol alan fimbriyal yapılar, yüzey hidrofobisitesi, hareket, fagositoz gibi özellikleri üzerine değiştirici etkileri tanımlanmıştır (4,8,9). Bu etkiler sonuçta virulans özelliğinde azalmaya neden olabilmektedir.

Bu çalışmada siprofloksasinin subminimal inhibitör konsantrasyonlarının *E.coli* suşlarının hemagglütinasyon (HA) ve MRHA özellikleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya idrar kültüründen soyutlanmış, daha önceden *E. coli* olarak tanımlanmış ve MRHA özellikleri pozitif olarak belirlenmiş olan dört klinik suş dahil edilmiştir.

Hemagglütinasyon ve MRHA özelliklerinin belirlenmesi. Hemagglütinasyon için tüm suşların kanlı agar ve Colonization factor antigen (CFA) agar besiyerlerindeki kolonileri kullanılmıştır (7,8). CFA agar; %1 casamino asit, %0.15 yeast extract, %0.002 MgSO₄, %0.005 MnCl₂ ve %2 agar içerecek şekilde hazırlanmıştır(9).

Suşların 37 °C'de bir gecelik inkübasyondan sonraki kültürlerinden fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) içinde süspansiyonları (yoğunluk yaklaşık 10⁹-10¹⁰ CFU/ml olacak şekilde) hazırlanmıştır. HA ve MRHA özelliği lam aglütinasyon yöntemi ile araştırılmıştır. Test için 0 grubu insan kanından elde edilen eritrositlerin PBS içinde %3 oranında süspansiyonu hazırlanmıştır. Ayrıca %3 D-mannozlu ve D-mannozsuz PBS solüsyonları hazırlanmıştır. Lam üzerinde bir damla (25µl) hazırlanmış olan bakteri süspansiyonu ile bir damla eritrosit süspansiyonu karıştırılmıştır; buna bir damla mannozlu veya mannozsuz PBS eklenmiş ve oda sıcaklığında ve +4 °C'de 5 dakika sonunda aglütinasyon varlığı değerlendirilmiştir. Aglütinasyonun mannoz varlığında inhibe olmaması durumunda MRHA pozitif olarak kabul edilmiştir. Bu işlemler hem kanlı agar hem de CFA agarda üreyen koloniler ile yapılmıştır.

Minimal inhibitör konsantrasyonun (MİK) saptanması. Çalışmaya alınan suşların kanlı agar-daki bir gecelik inkübasyondan sonraki taze kültürlerinden bulanıklık 0.5 McFarland olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmış; daha sonra bu bakteri süspansiyonları son yoğunluğu 10⁶ CFU/ml olacak şekilde dilüe edilmiş ve MİK araştırmasında bu yoğunlukları kullanılmıştır (5). MİK araştırması sıvı dilüsyon yöntemi ile, katyon-ayarlı Mueller-Hinton buyyon kullanılarak yapıldı. Sonuçlar 37 °C'de 18 saat inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir (10).

Subminimal inhibitör konsantrasyonlarda MRHA araştırılması. Bir gecelik inkübasyondan sonra MİK değerleri belirlenmiş olan tüm suşların 1/2xMİK, 1/4xMİK, 1/8xMİK ve 1/16xMİK tüplerinden HA ve MRHA varlığı yukarıda açıklanan yöntem ile araştırılmıştır.

Hiç aglütinasyon gözlenmedi ise negatif, aglütinasyon gözlendi ise; belirgin bir şekilde aglütinasyon oluşumundan zayıf bir aglütinasyon oluşumuna göre (+++), (++), (+) pozitif şeklinde değerlendirilerek yorumlanmıştır (5).

BULGULAR

İncelenen dört *E.coli* suşunun MİK değerleri: 1, 0.5, 0.5 ve 0.125 mg/ml olarak belirlenmiştir. Suşların tüm sub-MİK değerlerinde HA ve MRHA özelliğinin pozitif olarak devam ettiği saptanmıştır. MRHA özelliği dört suşun ikisinde 1/2x MİK' de (+), diğer konsantrasyonlarda (+++) olarak yorumlanmıştır. Diğer iki suşta tüm sub-MİK'lerde (+++) değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA

E.coli suşlarında fimbriyal yapılar üzerine pek çok çalışma yapılmıştır (5-7, 11-13). Özellikle piyelonefritli hastalardan soyutlanan suşların önemli bir kısmında MRHA varlığı gösterilmiştir. Antibiyotiklerin düşük dozlarında bakterilerin virulans özellikleri üzerine etkilerinin olup olmadığı, profilaktik tedavi protokollerinin düzenlenmesinde

üzerinde çalışılan bir konudur. *E.coli* suşlarının özellikle kinolon grubu antibiyotikler olmak üzere sub-MİK'lerde çeşitli virulans özelliklerinin ne ölçüde etkilendiğine dair çalışmalar vardır (8,9,14-18). Yapılan çalışmalar özellikle konak yapılarına tutunmada rol alan fimbriyal yapılar, adherans ve hücre yüzey hidroforisitesi üzerinedir.

Bu çalışmada üriner infeksiyon etkeni olan *E.coli* suşlarının fimbriyal özelliklerinin siprofloksasinin sub-MİK'lerindeki değişimi incelenmiştir. İncelenen tüm suşlar MRHA yapan fimbriyal yapılar içeriyordu. MRHA yapan fimbriyal yapıların varlığı sub-MİK çalışması yapılmadan önce hem kanlı agar hem de CFA agardaki koloniler kullanılarak araştırılmıştır. Literatürde MRHA araştırmalarında farklı yaklaşımlar vardır. HA veya MRHA araştırmaları bakterilerin yüzeyinde eksprese olan fimbriyal yapıların insan veya guinea-pig eritrositleriyle hemagglutinasyon vermesi temelinde yapılmaktadır. Bu amaçla insan veya guinea-pig A veya O grup eritrositleri ile tüp, lam veya mikropate yöntemi kullanılarak yapılan farklı çalışmalar vardır (5,6,13). Ayrıca bakterilerin bir kaç günlük sıvı besiyerinde inkübasyondan sonra katı besiyerine yapılan ekimlerinde oluşan kolonilerinin kullanıldığı çalışmalar ve bir gecelik katı besiyerinde inkübasyondan sonraki kolonilerin kullanımı ile yapılan çalışmalar vardır (6,7). CFA agarın fimbriyal yapıların daha iyi eksprese olması ve belirginleşmesi amacıyla kullanılması önerilmektedir, ancak kanlı agar ve CFA agar kullanılarak yapılan farklı çalışmalar vardır (5-7). MİK araştırılması için standart olarak kanlı agardaki bir gecelik üremeden sonraki kolonilerin kullanımı önerilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda sub-MİK saptanmadan önce suşların HA ve MRHA özellikleri hem CFA agarda hem de kanlı agarda üreyen koloniler kullanılarak incelenmiştir. CFA agarda yapılan çalışmada biraz daha güçlü agglutinasyon elde edilmiş olmakla birlikte, kanlı agarda üreyenlerde de belirgin agglutinasyon gözlenmiştir. MİK çalışması ve sub MİK çalışması, çalışmanın aşırı fimbriyalasyon-

dan etkilenmemesi için kanlı agarda bir gecelik üremeden sonra elde edilen kolonilerden yapılmıştır ve 1/2, 1/4, 1/8, 1/16xMİK'deki tüplerden HA ve MRHA varlığı araştırılmıştır. Tüm suşlarda siprofloksasinin farklı sub-MİK değerlerinde hemagglutinasyon ve MRHA özelliğinin devam ettiği gözlenmiştir. İki suşta 1/2xMİK'te azalmış olmakla birlikte yine de agglutinasyon gözlenmiştir. Kinolon grubu antibiyotiklerin sub MİK'lerinin bakterilerin fimbriyal yapıları ve aderansını azalttığını, inhibe ettiğini bildiren çalışmalar yanında (8,14,16,17), arttırdığını bildiren (18) çalışmalar da vardır.

Baskın ve ark(14) üç farklı florokinolonun sub-MİK konsantrasyonlarda *E.coli* suşlarının MRHA ve adherans özellikleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında siprofloksasinin sadece 1/2xMİK de hemagglutinasyon inhibisyonu yaptığını bildirmişlerdir.

Yapılan diğer bir çalışmada siprofloksasinin 0.25 MİK ve 0.125 MİK konsantrasyonlarında kontrole göre suşların aderans etkisini azaltmış olduğunu ancak aderans özelliğinin azalmış olmakla birlikte devam ettiği gösterilmiştir(16). Balague ve ark(18) 25 *E.coli* suşu üzerinde yaptıkları çalışmalarında siprofloksasinin 1/4xMİK konsantrasyonunda kontrole göre 12 suşta anlamlı bir değişim saptamadıklarını ancak 13 suşta kayda değer şekilde hemagglutinasyon ve hücre yüzey hidroforisitesinde artış gözlediklerini bildirmişlerdir.

Antibakteriyel maddelerin infeksiyonu tedavi edecek ancak konak hücrelere zarar vermeyecek uygun dozlarda kullanımı önemlidir. Her antibakteriyel maddenin serum konsantrasyonu ve doku konsantrasyonu farklıdır. Genellikle dokulara ulaştığında antibakteriyel maddelerin MİK değerlerinin altındaki konsantrasyonlarda bulunduğu belirtilmektedir (2). Bu nedenle çeşitli antibakteriyel maddenin sub-MİK konsantrasyonlarının bakterilerin virulans özellikleri üzerine etkilerinin (azaltıcı veya arttırıcı) bilinmesi tedavi yaklaşımları açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Özüt H, Çalangu S. İdrar yolu infeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. *İnfeksiyon Hastalıkları* 1. baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 1996: 921-6.
2. Svanborg C, Godaly G. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11: 513-529.
3. Parlak E, Erol S, Kızılkaya M, Altıparlak Ü, Parlak M. Yoğun bakım hastalarında görülen nozokomiyal üriner sistem infeksiyonları. *Mikrobiol Bult* 2007; 41: 39-49.
4. Craig WA. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1-12.
5. 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: 508-513.
6. 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.
7. Evans DJ, Evans DG, Höhne C, Noble MA, Haldane EV, Lior H, Young LS. Hemolysin and K antigens in relation to serotype and hemagglutination type of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *J Clin Microbiol.* 1981; 13: 171-8.
8. Braga PC, Sala MT, Sasso MD. Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of rifloxacin on bacterial virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1013-1019.
9. Braga PC, Sala MT, Sasso MD. sub MIC concentration of cefodizime interfere with various factors affecting bacterial virulence. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 15-25.
10. Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları; Onaltıncı Bigi Eki. (Clinical and Laboratory Standards Institute /CLSI : Çeviri Editörü Gür D.) Ankara:Bilimsel Tıp Yayınevi, 2006.
11. 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: 223-229.
12. 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 Mikrobiyol Cem Derg* 2000; 30: 85-92.
13. Hoşgör M, Coşar G, Ermertcan Ş, Çarıkçı AY. Üropatojen *Escherichia coli* kökenlerinin bazı virulans özellikleri. *İnfeks Derg* 2000; 14: 225-228.
14. Baskın H, Doğan Y, Bahar IH, Yulug N. Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic strains of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 79-82.
15. Kovarik JM, Hoepelman IM Verhoef J. Influence of Fluoroquinolones on expression and function of P fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 684-688.
16. Drago L, Vecchi ED, Mombelli B, Nicola L, Vali M, Gismondo MR. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2001;48: 37-35.
17. Vidya KC, Malya PS, Rao PS. Inhibitor of bacterial adhesion by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23: 102-105.
18. Balagué CI, Fernández L, Pérez J, Grau R. Effect of ciprofloxacin on adhesive properties of non-P mannose-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 401-404.