

Escherichia coli Suşlarında Çeşitli Antibiyotiklere Direncin Hemolizin Üretimi ve Tipleri ile İlişkisi

Ömer KÜÇÜKBASMACI(*), Özden BÜYÜKBABA-BORAL(**), Tolga ÖĞÜT(**),
Serdar SUSEVER(**), Mine ANĞ-KÜÇÜKER(**), Özdem ANĞ(**)

(*) İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Çapa, İstanbul

(**) İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

ÖZET

Yüz klinik Escherichia coli suşu hemolizin üretimi, hemolizin tipleri ve ampisilin, ampisilin-sulbaktam, gentamisin, trimetoprim-sulfometoksazol, tetrasiklin, nalidiksik asit, norfloksasin, ofloksasin ve siprofloksasin direnci arasındaki ilişki bakımından incelenmiştir. Suşların 24'ü en az bir tip hemolizin üretmektedir. Hemolitik olmayan suşlarda hemolitik olanlara göre norfloksasin ve siprofloksasin direncine daha yüksek oranda rastlanılırken ($p<0.05$), diğer antibiyotikler için böyle bir ilişki bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotiklere direnç, hemolizin, Escherichia coli

SUMMARY

The Relationship Between Haemolysin Production and Haemolysin Types and Resistance to Various Antibiotics among Escherichia coli Strains

One hundred clinical isolates of Escherichia coli were investigated for haemolysin production, haemolysin types and their relationship with resistance to ampicillin, ampicillin-sulbactam, gentamicin, trimethoprim-sulphometoxazole, tetracycline, nalidixic acid, norfloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin. 24 strains produce at least one type of haemolysin. The percentages of resistance to norfloxacin and ciprofloxacin, but not to other agents, among non-haemolytic isolates were significantly higher ($p<0.05$) than among haemolytic isolates.

Key Words: Antibiotic resistance, haemolysin, Escherichia coli

GİRİŞ

Kinolonlara direnç kullanıma girdikleri 1980'li yıllardan beri belirgin şekilde artmaktadır. Direnç kinolonların farklı hasta gruplarında yaygın olarak kullanımına bağlıdır (1). Kinolon direnci DNA giraz veya topoizomeras IV gibi hedef enzimlerdeki değişikliklere bağlı olabileceği gibi, dış membran değişiklikleri ve/veya antibiyotiklerin aktif olarak dışarıya pompalanması yoluyla bileşiğin hücre içi yoğunluğunun düşürülmesiyle de gelişebilmektedir (2).

Escherichia coli (E.coli) birçok farklı tip hemolizin üretebilmektedir. Bunların başlıcaları α -hemolizin (hücre dışı), β -hemolizin (hücreye bağlı), γ -hemolizin (nalidiksik asit dirençli mutantlar tarafından salgılanır) ve enterohemolizindir (hücreye bağlı). α ve β hemolizinler değişik memeli türlerinde aynı aktiviteyi göstererek belirgin bir hemoliz zonu oluşturur-

lar. γ -hemolizinler ise insan ve tavşan eritrositlerini hemolize edememeleriyle, α ve β hemolizinlerden ayrılırlar (3). E.coli suşlarında α -hemolizin üretiminin üriner sistem infeksiyonları, sepsis ve diğer sindirim yolu dışında kalan infeksiyonlarla ilişkili olduğu birçok epidemiyolojik çalışmayla gösterilmiştir. Bu protein yüksek sitotoksik aktivite sahibi olmasının yanısıra fagositozu da etkileyebilmektedir (3,4).

Bu çalışmada üriner sistem infeksiyonu etkeni olarak izole edilen E.coli suşlarının başta kinolon grubu antibiyotikler olmak üzere çeşitli antibiyotiklere direncinin hemolizin üretimi ve hemolizin tipleri ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri: Çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda üriner sistem infeksiyonlu hastalardan izole edilen 100

E.coli suşu kullanılmıştır. Suşların hepsi ayrı hastalardan izole edilmiştir. Suşlar kullanıma kadar -70°C 'de %10 gliserol katkılı triptik soy sıvı besiyerinde saklanmıştır.

Antibiyotik duyarlılığı: Antibiyotik duyarlılığı disk difüzyon yöntemiyle saptanmıştır (5). Her suş için ampisilin (10 µg), ampisilin-sulbaktam (10/10 µg), gentamisin (10 µg), trimetoprim-sulfometoksazol (TMP/SMX) (1.25/23.75 µg), tetrasiklin (30 µg), nalidiksik asit (30 µg), norfloksasin (10 µg), ofloksasin (5 µg) ve siprofloksasin (5 µg) kullanılmıştır (Oxoid-Hemakim).

Hemolizin üretiminin saptanması:

α ve enterohemolizin: α ve enterohemolizinlerin saptanması için bakteriler 10 mM CaCl₂ ve üç kez PBS (pH 7.2) ile yıkanmış %5 koyun kanı ilaveli triptik soy agara ekilmiştir. Üç saat inkübasyon sonrası görülen hemoliz zonu α-hemolizin, aynı petrinin bir gece daha inkübe edilmesiyle oluşan ekstra hemoliz zonu ise enterohemolizin olarak değerlendirilmiştir (3,6).

β-hemolizin: %5 koyun kanlı agarda bir gecelik inkübasyondan sonra görülen hemoliz zonu β-hemolizin olarak değerlendirilmiştir (3).

γ-hemolizin: Mikroorganizmanın %5 koyun kanlı Columbia agarda hemoliz zonu oluşturup insan kanlıda oluşturmaması γ-hemolizin üretimi olarak değerlendirilmiştir (3).

İstatistik: Hemolitik ve hemolitik olmayan suşlar arasında antibiyotik direncinin istatistiksel olarak farklı olup olmadığı χ^2 ve Fisher kesin χ^2 testi (norfloksasin, ofloksasin ve siprofloksasin için) kullanılarak saptanmıştır. p değerinin <0.05 olduğu farklılıklar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Yüz E.coli suşu için antibiyotik direnç oranları ampisilin %49, ampisilin-sulbaktam %25, gentamisin %5, tetrasiklin %75, TMP/SMX %45, nalidiksik asit %40, norfloksasin %20, ofloksasin %23 ve siprofloksasin için %20 bulunmuştur. Türkiye için direnç oranları bölgelere göre farklılık gösterebilirse de, aynı Anabilim Dalı'nda 1996 yılında kinolonlara direncin %2 olarak bulunduğu bir çalışmadan oldukça yüksek ola-

rak bulunmuştur (7). Bu artış kinolonlara direncin son yıllarda hızla artmakta olduğunu bir kez daha doğrulamaktadır.

Suşların %24'ü en az bir tip hemolizin üretirken kalan %76'sı hiçbir besiyerinde hemolitik aktivite göstermemişlerdir. Üçlü (α, β, γ) tipi %9 ile en sık belirlenen hemolizin tipi olmuştur. Hemolizin tipleri ve antibiyotiklere direnç arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 1). Norfloksasin ve siprofloksasine karşı dirence hemolitik olmayan suşlarda hemolitik olanlara göre daha fazla rastlanırken (p<0.05) diğer antibiyotiklerde böyle bir farklılık belirlenmemiştir. Ayrıca nalidiksik asit ve ofloksasinde de hemolitik olmayan suşlarda direnç daha yüksek bulunmuştur fakat aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 2).

Hariharan ve ark. (8) ishelli domuzlardan elde edilen hemolitik ve ısıya duyarlı enterotoksin üreten E.coli Tablo 1. 24 hemolitik E.coli suşunda hemolizin tiplerinin dağılımı.

	α	β	γ	α+β	β+E	α+β+γ	α+β+γ+E
n (%)	3 (12.5)	1 (4.2)	4 (16.7)	3 (12.5)	2 (8.3)	9 (37.5)	2 (8.3)

Tablo 2. 24 hemolitik ve 76 hemolitik olmayan E.coli suşunda antibiyotiklere direnç.

Antibiyotik	% Direnç	
	Hemolitik	Hemolitik olmayan
Ampisilin	50	48.7
Ampisilin-sulbaktam	37.5	21
Gentamisin	8.3	3.9
Trimetoprim-sulfometoksazol	45.8	44.7
Tetrasiklin	75	75
Nalidiksik asit	33.3	50
Norfloksasin	4.1*	25
Ofloksasin	8.3	27.6
Siprofloksasin	4.1*	25

* : p<0.05

suşlarının, her iki virülans faktörüne sahip olmayan suşlara oranla daha sık TMP/SMX, neomisin ve tetrasiklin direncine sahip olduklarını belirlemişlerdir. Martinez-Martinez ve ark. (9) hemolitik olmayan E.coli suşlarında kinolonlara ve tetrasikline daha yüksek oranda dirence rastlamışlardır. Buna karşılık bu çalışmada diğer araştırmacılardan farklı olarak hemolitik ve hemolitik olmayan suşlar arasında gentamisin, tetrasiklin ve TMP/SMX direnci arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Martinez-Martinez ve ark. (9) aynı çalışmalarında in vitro koşullarda siprofloksasin dirençli hale getirilen hemolitik ve siprofloksasin du-

yarlı *E.coli* suşlarının hemolizin üretmeye devam ettiklerini göstermişlerdir. Hemolizin aktivitesi ve antibiyotik direnci arasında ki bu ilginç birlikteliği oluşturan mekanizmalar halen tam olarak bilinmemektedir. Hemolizin sekresyonu için özellikle gerekli bir dış membran proteini olan TolC, bu birliktelik için bir açıklama olarak değerlendirilebilir. TolC mutasyonları çok farklı şekillerde gerçekleşebilmektedir ve beraberinde kendisiyle ilgili ilgisiz birçok genin ekspresyonunu etkileyebilmektedir (10). Bir başka açıklama ise lipopolisakkarit biosentezindeki genlerdeki mutasyonlar olabilir; bu tip mutasyonların bazı bakteriyofajlara, novobiosin gibi bileşiklere dirençte rol oynadığı bilinmektedir (11).

Gyr A mutasyonları *E.coli* suşlarındaki kinolonlara karşı en önemli direnç mekanizmalarıdır ve Martinez-Martinez ve ark. (9) DNA katlanmasındaki artışın hemolizin üretiminde yer alan genleri etkilemesinin mümkün olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Son zamanlarda *E.coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında plazmide bağlı siprofloksasin direnci bildirilmektedir (12).

Bagel ve ark. (13) kinolon dirençli *E.coli* suşlarında genellikle tip 1 fimbriya ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir, böylece gelişen kinolon direncinin bir şekilde bakteri virülansını azalttığını söylemek mümkündür. Bu çalışmada çoğu kinolon dirençli *E.coli* suşunun hemolitik aktiviteye sahip olmadığı gösterilmiştir ve aradaki fark siprofloksasin ve norfloksasin için anlamlı bulunmuştur. Hemolizin üretimi ve diğer antibiyotiklerle direnç arasında bir bağlantı gösterilememiştir ayrıca hemolizin tipleri ve kullanılan tüm antibiyotikler arasında bir bağlantı belirlenmemiştir. Antibiyotiklerin bakterilerde üremeyi durduran veya öldüren etkinlikleri dışında virülans faktörleri üzerine de etkili olabildiklerini gösteren daha geniş epidemiyolojik ve detaylı moleküler çalışmalara ihtiyaç olduğu da bir gerçektir.

KAYNAKLAR

1. Garau J, Xercavins M, Rodriguez-Carballeira M, Gomez-Vera JR, Coll I, Vidal D, Llovet T, Ruiz-Bremon A: Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2736-41 (1999).
2. Hooper DC: Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 7:337-41 (2001).
3. Beutin L: The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol* 180:167-82 (1991).
4. Bhakdi S, Muhly M, Korom S, Schmidt G: Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release. *J Clin Invest* 85:1746-53 (1990).
5. National Committee for Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement. NCCLS document M 100-S9, Wayne, Pennsylvania USA (1999).
6. Beutin L, Montenegro MA, Orskov I, Orskov F, Prada J, Zimmermann S, Stephan R: Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 27:2559-64 (1989).
7. Aydın MD, Büyükbaba Ö, Anđ Ö: İdrar yolu infeksiyonu etkeni Enterobacteriaceae suşlarında kinolon duyarlılığı. *Ankem Derg* 19-23 (1996).
8. Hariharan H, Haeway J, Bryenton J: Observations on our production of haemolysin, heat labile enterotoxin and antimicrobial drug resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. *Compar Immunol Microbiol Infect Dis* 229-34 (1992).
9. Martinez-Martinez L, Fernandez F, Perea EJ: Relationship between haemolysin production and resistance to fluoroquinolones among clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 43:277-9 (1999).
10. Wandersman C, Delepelaire P: TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4776-80 (1990).
11. Bauer ME, Welch RA: Pleiotropic effects of a mutation in *rfaC* on *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* 65:2218-24 (1997).
12. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA: Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351:797-9 (1998).
13. Bagel S, Heisig P, Wiedemann P: Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* frequently is associated with decreased expression of type 1 fimbriae. In program and Abstracts of the Thirty-Seventh Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto. Abstract C-37,p 52. American Society for Microbiology, Washington, DC. (1997).