

Üriner Sistem İnfeksiyonu Bulunan Çocukların İdrarlarında İzole Edilen Escherichia coli Suşlarının Virülans Faktörleri ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları

Mustafa Zeki RUHİ(*), Hatice ÖZENCİ(**), Haluk ATAÖĞLU(**), Derya AYSEV(***)

ÖZET

Bu çalışmada; 43 asemptomatik bakteriüri (ABÜ), 36 sistit ve 21 piyelonefrit tanısı alan çocuğun idrar örneği ile 40 sağlıklı çocuğun dışkılarından izole edilen toplam 140 Escherichia coli suşunun P fimbriya, mannoz rezistan hemaglutinasyon (MRHA), tip 1 fimbria, hemoliz, serum direnci ve çoklu direnç gibi virülans faktörleri araştırılarak sonuçlar değerlendirildi.

İncelenen virülans faktörlerinin rastlanma oranları piyelonefrit, sistit, ABÜ ve kontrol gruplarına göre dağılımı, sırasıyla, P fimbriyanın %81, %58, %47, %10; MRHA için %81, %58, %47 ve %10; tip 1 fimbriya için %29, %50, %42 ve %28; hemolizin için %33, %31, %28 ve %0; serum direnci için %62, %47, %63 ve %43; çoklu direnç için %43, %31, %44 ve %5 olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak çocuklarda üriner sistem infeksiyonu etkeni E.coli suşlarının incelenen özelliklerinden başta P fimbria olmak üzere hemolizin, MRHA ve çoklu direnç özelliklerinin sık rastlanan virülans faktörlerinden olduğu ve P fimbria varlığının hemolizin veya çoklu direnç ile birlikte bulunduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler : Üriner sistem infeksiyonu, çocuk, Escherichia coli, virülans faktörleri, antibiyotiklere duyarlılık.

GİRİŞ

Çocukluk yaşlarında üst solunum yolları infeksiyonlarından sonra en sık rastlanan infeksiyon, üriner sistem ile ilgili infeksiyonlardır (1). Üriner sistem infeksiyonu (ÜSİ) lokalizasyon ve klinik

(*) Sağlık Bakanlığı Ankara İl Sağlık Müdürlüğü Yenimahalle Sağlık Grup Başkanlığı, Ankara
(**) Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
(***) Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara

SUMMARY

Virulence Factors and Susceptibility to Antibiotics of Escherichia coli Strains Isolated from Urine of Children with Urinary Tract Infection

In this study, P fimbriae, mannose resistant hemagglutination (MRHA), type 1 fimbriae, hemolysin, serum resistance of and multiple antibiotic resistance were investigated for Escherichia coli strains (n=140) isolated from the urine of children with asymptomatic bacteriuria (ABU). (n=43), cystitis (n=36), and pyelonephritis (n=21) and from the fecal flora of healthy children (n=40).

Investigated virulence factors observed in pyelonephritis, cystitis, asymptomatic bacteriuria and control group are 81%, 53%, 37% and 10% for P fimbriae; 81%, 58%, 47% and 10% for MRHA; 29%, 50%, 42% and 28% for type 1 fimbriae; 33%, 31%, 28% and 0% for hemolysin; 62%, 47%, 63%, and 43% for serum resistance; 43%, 31% 44% and 5%, for multiple resistance, respectively.

Our results suggest that especially P fimbriae, and hemolysin, MRHA, multiple resistance are common virulence factors of E. coli isolated from urine of children with urinary tract infections. P fimbriae phenotype is seen with hemolysin or multiple resistance phenotypes.

Key Words: Urinary tract infection, children, Escherichia coli, virulence factors, antibacterial susceptibility.

önemine göre asemptomatik bakteriüri (ABÜ), piyelonefrit ve sistit şeklinde sınıflandırılmıştır (2). Mikroorganizmaların hastalık yapma yetenekleri virülans faktörlerine sahip olmaları ile ilişkilidir. Escherichia coli'nin bugün bilinen virülans faktörleri arasında P fimbriya, tip 1 fimbria, x adezinler, hemolizin sitotoksik nekrotizan faktör-1, serum direnci, K antijen varlığı, siderofor, antibakteriyellere direnç, sayılabilir (3,4,5).

E.coli adezinleri mannoz varlığında

hemaglutinasyonun devam edip etmemesine göre “mannoza duyarlı hemaglutinasyon (MSHA)” ve “mannoza dirençli hemaglutinasyon (MRHA)” olarak isimlendirilen iki tip hemaglutinasyon oluştururlar (6).

E.coli'de MSHA, tip 1 fimbriya varlığında oluşmaktadır (7,8). E. coli suşlarında farklı tür ve kan gruplarından eritrositlerle MRHA oluşturan, farklı adezinler vardır. Bunların arasında üriner sistemde ve özellikle piyelonefritte en fazla önem kazananı P fimbriyadır. P fimbriya dışındaki MRHA oluşturan fimbriyal ve nonfimbriyal adezinlere genel olarak x adezinler denmektedir (5).

P fimbria P kan grubu antijenlerini reseptör olarak tanır (9). P kan grubu antijenleri, terminal yada internal bir α -D-galaktopiranozil (1-4) β -D-galaktopiranozil (Gal-Gal) molekülü içeren oligosakkaridlerden oluşmuş bir ailedir (10). Bu antijen insanlarda glikoproteinlerde, güvercin ve kuş yumurtalarında, hidatik kistlerde ve belli enterik bakterilerde bulunur (5,11).

Bu çalışmada; değişik yaş ve cinsiyetteki, asemptomatik bakteriüri, sistit ve piyelonefritli çocuk hastaların idrarlarından ve kontrol olarak sağlıklı çocukların dışkılarından izole edilen E.coli suşlarında, P fimbriya varlığının, MRHA tip 1 fimbriya, hemolizin serum direnci ve antimikrobiyal maddelere duyarlılığın belirlenmesi ve bulguların karşılıklı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda idrar örnekleri alınarak standart yöntemle ekimi yapıldı. 10^5 koloni oluşturan ünite/ml bakteri bulunan kültürleri değerlendirildi ve bakteriler klasik yöntemle tanımlandı. E.coli olarak belirlenen suşların ürettiği idrar örneklerinin alındığı hastaların klinik bilgileri not edildi. Virülans faktörleri olarak; mannoza dirençli hemaglutinasyon, P fimbriya, tip 1 fimbriya, hemolizin, serum direnci, çeşitli antibiyotiklere duyarlılık özellikleri çeşitli yöntemlerle araştırıldı.

Bakteri: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk

Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarına 16.2.1994 tarihinden başlayarak 29.2.1996 tarihine kadar başvuran çocuk hastaların, idrar örnekleri alındı. Ölçülü öze (0.001ml) kullanılarak kanlı agar ve endo besiyerlerine ekildi (12). Koloni sayısı 100000 ve üzeri olan idrar örneklerindeki bakteri kolonisinin özellikleri belirlendi ve biyotiplendirme işlemi standart yöntemlerle yapıldı (13). E.coli olarak tanımlanan 100 suş ve hasta çalışmaya alındı.

Hastalar : Çalışmaya alınan hastaların; ad, soyad, yaş, cinsiyet ve örneğin alındığı tarih kaydedildi. Huzursuzluk, beslenme güçlüğü, dizüri, pollaküri, hipotermi ile piyüri ve ateş $<38,5^{\circ}\text{C}$ olan hastalar sistit, bu semptomlar ve/veya kosta lomber hassasiyet, piüri, ateşin $\geq 38,5$ olması, sedimentasyon artması, C-reaktif proteinin pozitifliği bulgularından değişik kombinasyonlara sahip olan hastalar piyelonefrit, herhangi bir yakınması olmayan hastalar ise asemptomatik bakteriüri (ABÜ) klinik tanısı ile sınıflandırıldı (14,15).

Kontrol grubu olarak ÜSİ ve gastroenterit bulguları olmayan sağlıklı çocukların dışkı kültürlerinden üretilen ve normal flora üyesi kabul edilen 40 E.coli suşu çalışıldı. Suşlar dik jelozda 6 ayda bir pasajları yapılarak 4°C 'da saklandı.

Tip 1 fimbriya varlığının araştırılması: Kobay kalbinden sitratlı kan alınarak, fosfat tamponlu tuzlu su (0.01 M, pH 7.4) (PBS) ile üç kez yıkandı. PBS içinde %5'lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Eritrosit süspansiyonu ikiye bölünerek, birine %2,5 oranında metil α D-mannosid (Sigma) eklendi.

Suşların 10 ml nutrient broth (Difco) besiyerinde üç kez seri pasajı yapılarak 37°C 'de 3'er gün inkübasyonu sağlandı. Daha sonra bakteri santrifüjlenerek ayrıldı ve PBS ile 3 kez yıkandı. Bakterinin PBS içinde, Mc Farland iki eşeline göre süspansiyonu hazırlandı ($\sim 8 \times 10^8$ bakteri/ml). Bakteri süspansiyonundan iki damla lam üzerine kondu. Üzerine birer damla mannozlu ve mannozsuz kobay eritrosit süspansiyonu eklendi. Kontrol için eritrositlere PBS eklenerek, test tekrarlandı. Oda ısısında 10 dakika bekletilerek aglutinasyonun varlığı göz ve mikroskop ile kontrol edildi (16).

Mannoz varlığında engellenen hemagglütinasyon MSHA; mannoz varlığında hemagglütinasyonun olduğu durum ise MRHA olarak değerlendirildi. Kobay eritrositi ile MSHA gösteren suşlar tip 1 fimbria pozitif kabul edildi (7, 8).

Mannoz dirençli hemagglütinasyon deneyi : OP₁ grubu insandan sitratlı kan alınarak PBS ile 3 kez yıkanarak %5'lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Kan ikiye bölünerek, birine %2,5 oranında metil α D-mannosid eklendi.

Her suşun nutrient agar (Difco) besiyerine ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübasyon sonucunda elde edilen kültüründen 1-2 koloni öze ile alınarak 2 lamda birer damla PBS içinde süspansiyonu yapıldı. Üzerlerine birer damla mannozlu ve mannozsuz insan eritrosit süspansiyonu eklendi. Buz üzerinde 10 dakika bekletildi ve aglütinasyonun varlığı göz ve mikroskop ile kontrol edildi. Kontrol için eritrositlere PBS eklenerek test tekrarlandı (16). P fimbria veya X adezin ekspresyonu olması durumunda MRHA gözlenerek pozitif suşlar kaydedildi.

P fimbriya varlığının araştırılması: Güvercin yumurta beyazı ovomukoid (GOM) ayrılması: Güvercin yumurta beyazı ovomokoid (GOM) ayrıldı. +4°C'de homojenize edilirken üzerine 0.5 mol triklorasetik asit (Sigma)-Aseton (Merck) (1:2 hacim/hacim) eklenerek ekstraksiyon yapıldı. Örnek +4°C'de ve 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatana aseton eklenerek presipite edildi. Tekrar -4°C'de ve 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü ve çökelti distile suya karşı +4°C'de 18 saat diyaliz edildi. Elde edilen örneğin protein konsantrasyonu Folin-Lowry yöntemi (17) ile saptandı ve materyal liyofilize edilerek protein konsantrasyonu 10mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Konsantre materyal 1x50 cm Sephadex G100 (Sigma) jel filtrasyon kolonundan geçirildikten sonra fraksiyonlara ayrıldı. Son hacme göre %3 oranında β -merkaptotanol (Sigma) eklenerek redüksiyonu yapıldı. Doğal ve redüksiyona uğramış GOM'un tanımlanması amacıyla Sodyum Dodesil Sulfat-Poli Akrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve anti P₁ serum ile P₁

yapısında ek aktivitesinde protein olup olmadığı araştırıldı (9).

Minimum aglütinasyon konsantrasyonunun saptanması (18): MRHA pozitif bakterilerin, MRHA testinde anlatıldığı şekilde süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan süspansiyondan 25 μ l mikropalak kuyucuğuna konduktan sonra PBS ile iki kat sulandırılarak bir seri dilüsyon hazırlandı. Üzerlerine 25 μ l insan eritrosit süspansiyonu eklenerek +4°C'de inkübe edildi. Aglütinasyon olduğu en son dilüsyon minimum aglütinasyon konsantrasyonu olarak kabul edildi.

Testin yapılışı (18): Minimum aglütinasyon konsantrasyonundan bir kat yoğun hazırlanan bakteri süspansiyonundan 25 μ l bir mikropalak kuyucuğuna konarak üzerine 25 μ l 100 ngr/ml GOM içeren PBS eklendi. +4°C'de 30 dakika inkübasyondan sonra bundan 25 μ l atıldı, diğer bir kuyucuğa minimum aglütinasyon konsantrasyonundaki bakteri süspansiyonundan 25 μ l kondu. Her iki kuyucuğa da 25 μ l insan eritrosit süspansiyonu eklenerek +4°C'da 30 dakika inkübe edildi. GOM'suz bakteri süspansiyonunun olduğu kuyucukta hemagglütinasyonun olması durumunda test değerlendirildi. GOM'lu kuyucuklarda P fimbria ile birleşen P₁ aktivitesindeki GOM1 bakterinin fimbriyaları ile insan eritrositlerini hemagglütine etmesini engeller. Bu nedenle hemagglütinasyon olmadığı kuyucuklardaki suşlar P fimbria pozitif kabul edildi.

Hemolizin varlığı : %5 koyun kanlı agara (Merck) ekim yapılarak 37°C'da 18-24 saat inkübasyondan sonra kolonilerin etrafında veya altında hemolizin görülmesi, pozitif kabul edildi (19).

Serum direncinin saptanması deneyi (20): Yönteme göre hazırlanan bakteri süspansiyonundan 0.2 ml alınarak 0.2 ml taze insan serumu ile karşılaştırıldı ve 30 dakika 37°C'de inkübasyondan sonra üzerine 2 ml beyin kalp infüzyonu buyyonu eklendi. Tüpler 37°C'da 3 ve 5 saat inkübasyondan sonra, optik dansitometre (Bausch & Lomb) ile optik dansiteleri okundu. Hanks ile hazırlanan bakteri süspansiyonu %1, %10 ve %50 oranlarında dilüe

edilerek üstlerine serum yerine Hanks solusyonu eklendi ve aynı şekilde işlemlerden geçirilerek optik dansitesi okundu.

Deney sonucunda serumla temastan sonra %10'u ve daha fazlası canlı kalan bakteriler serum dirençli kabul edildi.

Antibiyotik duyarlılık deneyleri : Çalışmaya alınan suşların antibakteriyal maddelere karşı duyarlılıkları Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi kullanılarak saptandı (21). Deney Muller -Hinton agar (Oxoid) plaklarında amikasin 30 µg, ampisilin 10 µg, gentamisin 10 µg, imipenem 10 µg, kloramfenikol 30 µg, nalidiksik asit 30 µg, netilmisin 30 µg, nitrofurantoin 300 µg, ofloksasin 5 µg, piperasilin 100 µg, sefiksim 5 µg, sefotaksim 30 µg, seftriakson 30 µg, sefuroksim 30 µg, tetrasiklin 30 µg (Oxoid), amoksisilin / klavulonat 20/10 µg ve trimetoprim / sulfametaksazol 1.25/23.75 µg (Bioanalyse), içeren antibiyotik diskleri kullanılarak yapıldı. İnhibisyon zon çapı ölçülerek NCCLS, M100-S7 tablosuna göre dirençli suşlar saptandı (21).Beş ve üzerinde antibiyotiğe dirençli olan suş, çoklu direnç pozitif kabul edildi.

İstatistik analizleri: Sonuçların istatistiksel analizleri χ^2 testi uygulanarak yapıldı.

BULGULAR

Çalışmanın hasta grubu 13 (%13) erkek, 87 kız (%87) ve kontrol grubu 15 (%38) erkek, 25 (%62) kız çocuktan oluşturuldu. Olgular 3 günlük - 13 yaşlar arasındaydı. Hasta grubu 43 asemptomatik bakteriüri, 36 sistit, 21 piyelonefrit klinik tanılarına dağıldı.

Çalışılan tüm suların 62'sinde (%44) MRHA, 56'sında (%40) P fimbria, 53'ünde (%38) tip 1 fimbria, 30'unda (%21) hemolizin, 74'ünde (%53) serum direnci ve 41'inde (%29) çoklu direnç pozitifliği saptandı. Tablo 1'de klinik tanılara göre virülans özelliklerinin dağılımı görülmektedir.

Kontrol grubu ile hasta grupları virülans özelliklerinin dağılımı açısından χ^2 testi uygulanarak karşılaştırıldı:

MRHA: Sistit ile diğer iki tanı grubu arasında fark bulunmazken ($p>0.05$); kontrol grubu diğer gruplardan düşük yüzdeye ($p<0.001$); piyelonefrit grubu, asemptomatik bakteriüri grubundan yüksek yüzdeye ($p<0.01$) sahip bulundu.

P fimbriya: Asemptomatik bakteriüri ile sistit arasında fark bulunmazken ($p>0.05$); kontrol grubu diğer gruplardan düşük yüzdeye ($p<0.001$); piyelonefrit grubu, asemptomatik bakteriüri ($p<0.01$) ve sistit ($p<0.05$) gruplarından yüksek yüzdeye sahip bulundu.

Tip 1 fimbriya: Gruplar arasında fark saptanmadı ($p>0.05$).

Hemolizin: Asemptomatik bakteriüri, sistit ve piyelonefrit grupları arasında fark saptanmazken ($p>0.05$); kontrol grubu, diğer 3 çalışma grubundan düşük yüzdeye ($p>0.01$) sahip bulundu.

Serum direnci: Gruplar arasında fark saptanmadı ($p>0.05$).

Çoklu direnç: Asemptomatik bakteriüri, sistit ve piyelonefrit grupları arasında fark saptanmazken ($p>0.05$); kontrol grubu diğer 3 çalışma grubundan düşük yüzdeye ($p>0.001$) sahip bulundu.

P fimbriya ile diğer virülans faktörlerinin ilişkisi: P fimbriasız 84 suşta 35 (%42) tip 1 fimbria, 8 (%10) hemolizin, 42 (%50) serum direnci ve 18 (%21) çoklu direnç pozitif suş saptandı (şekil 1). P fimbriyalı 56 suşta 18 (%32) tip 1 fimbria, 32 (%57) serum direnci, 23 (%41) çoklu direnç ve 22 (%39) hemolizin pozitif suş saptandı (şekil 1). P fimbriyalı ve P fimbriasız suş gruplarında tip 1 fimbriya ve serum direnci pozitif suşların dağılımında χ^2 testi uygulanarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). Buna karşın hemolizin ($p<0.001$) ve çoklu direnç ($p<0.05$) pozitif suşlar, P fimbriyalı grubunda, P fimbriasız grubuna göre χ^2 testi ile anlamlı olarak yüksek oranda bulundu.

TARTIŞMA

Çocuklarda ÜSİ'lerinin %90'dan fazlasında etken E. coli'dir (22). Yapılan çalışmalarda kolonda saprotif olarak bulunan E. coli suşları ile ÜSİ'na neden olan E.coli suşları arasında patojenite farkları bulunmuştur. Bu nedenle bu suşlara bazı araştırmacılar tarafından üropatojen E. coli denmiştir.

MRHA: E.coli suşlarında farklı tür ve kan gruplarından eritrositlerle MRHA oluşturan, P fimbriya ve X adezinler bulunur. Bunların içinde üriner sistemde en fazla önem kazanan P fimbriyadır (5). Yapılan çalışmalarda ÜSİ etkeni E.coli suşlarında %12-73 gibi değişik oranlarda MRHA saptanmıştır (23- 27).

Tablo 1. Klinik tanımlara göre tip 1 fimbriya, MRHA, P fimbriya, serum direnci ve hemolizin pozitif suşların dağılımı ve klinik tanı içindeki pozitif suşların % oranları

Klinik Tanı n ^Φ	Piyelonefrit 21	Sistit 36	ABÜ [□] 43	Kontrol 40	Toplam 140
MRHA	17* (81)**	21 (58)	20 (47)	4 (10)	62 (44)
P fimbriya	17 (81)	19 (53)	16 (37)	4 (10)	56 (40)
Tip 1 fimbriya	6 (29)	18 (50)	18 (42)	11 (28)	53 (38)
Hemolizin	7 (33)	11 (31)	12 (28)	0 (0)	30 (21)
Serum Direnci	13 (62)	17 (47)	27 (63)	17 (43)	74 (53)
Çoklu Direnç	9 (43)	11 (31)	19 (44)	2 (5)	41 (29)

^Φ Klinik tanımlanan suş sayısı

[□] Asemptomatik bakteriyüri

* Klinik tanıdaki pozitif suş sayısı

** Klinik tanıdaki pozitif suşların % oranı

Çalışmamızda MRHA pozitif suşların dağılımı tablo 1’de özetlenmiştir. Kontrol grubunda diğer gruplardan daha düşük oranda MRHA gözlenmekte ve piyelonefrit grubunda MRHA en yüksek oranda görülmektedir. Sonuçlarımız çocuk popülasyonundan çalışan diğer araştırmacıların bulguları ile uyumlu bulunmuştur (14, 28). Bu sonuçlarla E.coli suşlarının MRHA yeteneğinin çocuklarda ÜSİ ve özellikle piyelonefrit oluşturmada önemli bir virülans faktörü olduğu sonucuna varılmıştır.

Ülkemizde klinik tanıları ayırmadan yapılan kontrollü çalışmalarda, çalışmamıza benzer şekilde idrar örneklerinden izole edilen suşlarda kontrol grubundan daha yüksek oranda MRHA saptanmıştır (29, 30). Böylece MRHA’un ÜSİ’u oluşumunda önemli bir virülans faktörü olabileceği sonucuna varılmıştır.

P fimbriya: P fimbriyalar insan P₁ grubu eritrositleri ile MRHA göstermektedir. Bu P fimbriya fenotipini araştırmak için yeterli olmamaktadır. Çünkü MRHA’u X adezinler de yapmaktadır. P fimbriya fenotipinin üriner sistemde infeksiyon etkeni E.coli suşlarında X adezinlere göre çok daha yaygın olması

nedeniyle MRHA, göreceli olarak bir fikir vermektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda ÜSİ’den izole edilen E. coli suşlarında %34-66 arasında değişen oranlarda P fimbriya saptanmıştır (26, 31, 32, 33).

Çalışmamızda güvercin ovomukoidi ile hemagglütinasyon inhibisyon testi ile P fimbriya varlığını araştırdık. MRHA pozitif 62 suşta GOM ile hemagglütinasyon inhibisyon testi çalışıldı. Bu suşların 6’sında negatif ve 56’sında pozitif hemagglütinasyon inhibisyon sonucu alındı. Bu sonuçlarla çalışmamıza alınan suşların 56’sının (%40) P fimbriya ve en az 6’sının X adezin fenotipine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda P fimbriya ve X adezin fenotiplerinin ikisine de sahip olan suşlarda sadece P fimbriya fenotipi ortaya çıkarıldığından, bu suşlarda X adezin fenotipine sahip suşların sayısı bilinmemektedir.

Çalışmamızda P fimbriya fenotipi pozitif suşların dağılımı tablo 1’de özetlenmiştir. Piyelonefrit grubunda diğer tanı gruplarından anlamlı olarak yüksek oranda saptanırken, dışkı grubunda diğer tanı gruplarına göre anlamlı olarak düşük oranda bulunmuştur. Sonuçlarımız çocuk popülasyonunda çalışan diğer araştırmacıların bulguları ile uyumlu bulunmuştur (8, 28, 34, 35, 36). Çalışmamız sonucunda ülkemizde çocuk hastalarda ÜSİ ve özellikle piyelonefrit oluşumunda P fimbriyanın diğer toplumlarda yapılan çalışmalara benzer şekilde önemli bir virülans faktörü olduğu sonucuna varılmıştır.

Tip 1 fimbriya : İlk tanımlanan fimbriya yapısı tip 1 fimbriyadır. Tip 1 fimbriya başlıca kobay eritrositlerinde MSHA oluşması ile anlaşılmaktadır. E. coli’de kobay eritrositi ile MSHA oluşturan başka bir yapı yoktur. Tip 1 fimbria genotipi E. coli suşları arasında %92-100 gibi oldukça yüksek oranlarda bulunmaktadır (4,32,34,37). Buna karşın fenotip %14-90 gibi değişen oranlarda gözlenmektedir (27,34,37,38).

Çalışmamızda tip 1 fimbria fenotipi pozitif suşların dağılımı tablo 1’de özetlenmiştir. Klinik tanı grupları arasında birbirleri ve kontrol grubu ile dağılımda anlamlı fark saptanmamıştır. Sonuçlarımız çocuk

popülasyonunda çalışan diğer araştırmacıların bulguları ile uyumlu bulunmuştur (8, 28, 39). Böylece tip 1 fimbriyanın ÜSİ'ü oluşumunda bir virülans faktörü olmadığı sonucuna varılmıştır.

Hemolizin: Birçok organizmada, mukoza yüzeyini infekte eden bakteriler, eğer kolonizasyona izin veren faktörlerle birlikte sitotoksin salma özelliğine de sahipse hastalık oluşturabilirler. E. coli'de sekrete edilen α hemolizini ve hücreye bağlı β hemolizin ile bu ikisinden farklı hemoliziner tanımlanmıştır α hemolizin dışındakilerin prevalans ve klinik önemleri bilinmemektedir.

Çalışmamızda hemolizin fenotipi pozitif suşların dağılımı tablo 1'de görüldüğü şekilde dışkı izolatlarında anlamlı olarak düşük oranda saptanmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda ÜSİ etkeni E. coli suşlarında hemolizin fenotipi %38-45 oranları gibi çalışmamızda saptanan %30 oranına yakın oranlarda saptanmıştır (25, 27, 32, 33). Yapılan diğer kontrollü çalışmalarda çalışmamıza benzer şekilde idrar grubunda kontrol grubuna göre yüksek oranda hemolizin fenotipi saptanmıştır (30, 40, 41, 42).

Klinik tanı gruplarını ayırarak yapılan çalışmalarda hemolizini fenotipinin dağılımı; çalışmamızla uyumlu olarak benzer oranlarda oluşmuştur (5, 8, 39).

Sonuç olarak hemolizinin ÜSİ'nunda belli klinik tabloları seçmemesine rağmen, ÜSİ oluşumunda rolü vardır. Dolayısı ile bir virülans faktörüdür diyebiliriz.

Serum direnci : Bakteriler, normal insan serumu tarafından, kompleman sisteminin litik etkisi sonucu öldürülür. Spesifik antikor olmadan, bakteriler tarafından kompleman sistemi alternatif yol ile aktive edilir. Bakteriler, komplemanın öldürücü etkisinden, serum rezistansı gibi çeşitli mekanizmalarla kaçarlar. Serum rezistansı sıklıkla çok faktörlüdür.

Çalışmamızda serum dirençli suşların dağılımı tablo 1'de görüldüğü gibi dört grup arasında anlamlı fark göstermemektedir. Çalışmamıza benzer şekilde yapılan Olling ve ark.'nın (20) çalışmasında da benzer dağılım gözlenmiştir. Tanı gruplarını ayırarak

yapılan çalışmalarda yine benzer dağılım izlenmektedir (4, 36).

Sonuç olarak serum direncinin ÜSİ'ü oluşumunda bir virülans faktörü olmadığı sonucuna varılmıştır.

Antibakteriyel maddelere çoklu direnç : Bakterilerde antibakteriyel maddelere karşı direnç değişik mekanizmalarla kazanılmaktadır. Dirençli suşların neden olduğu infeksiyonun tedavisi daha güç olmaktadır. Bu özellik bakteriye infeksiyonun oluşmasından çok, infeksiyon oluşuktan sonra uygulanan tedaviye rağmen konakta varlığını sürdürme ve infeksiyonu devam ettirme özelliği kazandırmaktadır.

Çalışmamızda beş ve üzerinde antimikrobiyal maddeye karşı dirençli suşların dağılımı tablo 1'de görülmektedir. Çoklu direnç pozitif suşlar dışkı grubunda, diğer 3 gruptan anlamlı olarak düşük oranda saptanmıştır. En az bir antibakteriyel maddeye direnç özelliği, Hull ve ark.nın (4) sistit ve ABÜ gruplarını ayırarak yaptığı çalışmada, çalışmamızın sistit ve ABÜ gruplarının dağılımına benzer şekilde birbirine yakın oranlarda olduğu görülmektedir.

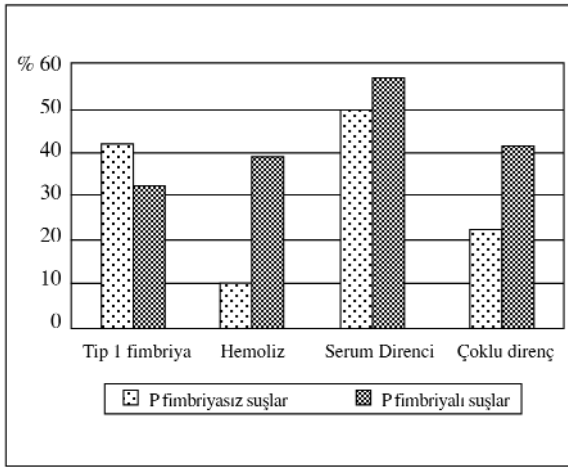
Çalışmamız sonuçları ile ÜSİ'da çoklu direncin, virülans faktörü olduğu sonucuna varılmıştır.

P fimbriya ile diğer virülans faktörlerinin ilişkisi : ÜSİ'na neden olan E. coli'lerde çoğu kez P fimbriya, tip 1 fimbriya, X adezinler, hemolizin üretimi, sitotoksik nekrotizan faktör-1, serum direnci, serotip, K antijen varlığı, siderofor üretebilme yeteneği ve antimikrobiyal ajanlara direnç gibi virülans faktörlerinden iki veya daha çoğu bulunur (5). Bu suşlar ÜSİ'nu için daha virülans olarak bilinmektedir.

Çalışmamızda P fimbriyalı ve P fimbriyasız suşlarda virülans faktörlerinin dağılımı şekil 1'de görüldüğü gibi P fimbriyalı suşlarda hemolizin veya çoklu direnç fenotipleri P fimbriyasız suşlara göre anlamlı olarak yüksek oranda bulunurken, tip 1 fimbriya ve serum direnci fenotiplerinde iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

Daha önce P fimbriya ve hemolizin fenotiplerini karşılıklı değerlendiren çalışmalarda hemolizin fenotipi ile P fimbriya fenotipinin birlikte bulunması çalışmamıza benzer şekilde anlamlı olarak yüksek oranda bulunmuştur (32, 33). Yapılan çalışmalarda serum direnci ve tip 1 fimbriya fenotipini çalışmamıza benzer şekilde P fimbriyalı ve P fimbriyasız suşlarda birbirine yakın oranlarda saptamışlardır (32, 33, 40). Bu sonuçlar P fimbriya fenotipinin hemolizin veya çoklu direnç fenotipleri ile birlikte olduğunu ancak tip 1 fimbriya veya serum direnci fenotipleri ile birlikte olmadığını göstermektedir.

Şekil 1. P fimbriyalı ve P fimbriyasız suşlardaki tip 1 fimbriya, hemolizin, serum direnci ve çoklu direnç pozitif suşların % oranlarının grafiği



Sonuç olarak E. coli suşlarının çocuklarda ÜSİ ve özellikle piyelonefrit oluşumunda başta P fimbriya olmak üzere hemolizin, MRHA ve çoklu direnç özelliklerinin virülans faktörü olarak rol oynadığı, fakat tip 1 fimbriya ve serum direnci özelliklerinin virülans faktörü olmadığı ve P fimbriya fenotipinin hemolizin veya çoklu direnç fenotipleri ile birlikte bulunduğu ancak tip 1 fimbriya veya serum direnci fenotipleri ile birlikte olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR:

1. Şirin A, Tanman F, Emre S: Üriner sistem ve hastalıkları. "Neyzi O, Ertuğrul TY, Koç L (ed): Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları", Sayfa: 188, 3. kitap 12. Bölüm-

Bayda, İstanbul (1984).

2. Bilgehan H: Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Bölüm 7 İzmir, Barış Yayınları (1992).

3. Andreu A, Stapleton AE, Fennell C, Lockman HA, Xercanins M, Fernandez F, Stamm WE: Urovirulans determinants in Escherichia coli strains causing prostatitis, J Infect Dis 176:464 (1997).

4. Hull RA, Rudy DC, Wieser IE, Donovan WH: Virulence factors of Escherichia coli isolates from patients with symptomatic and asymptomatic bacteriuria and neuropathic bladders due to spinal cord and brain injuries, J Clin Microbiol 36: 115 (1998).

5. Johnson JR: Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection, Clin Microbiol Rev 4:80 (1991).

6. Ottow JCG: Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili, Rev Microbiol 29:79 (1975).

7. Old DC, Roy AI, Tavendale A.: Differences in adhesiveness among type 1 fimbriate strains of Enterobacteriaceae revealed by an in vitro Hep2 cell adhesion model, J Appl Bacteriol 61:563 (1986).

8. Weserlund B, Siitinen A, Elo J, Williams PH, Korhanen TK, Makela PH: Properties of Escherichia coli isolates from urinary tract infections in boys, J Infect Dis 158:996 (1998).

9. Johnson JR, Swanson JL, Neill MA: Avian P₁ antigens inhibit agglutination mediated by P₁ fimbriae of uropathogenic Escherichia coli, Infect Immun 60: 578 (1992).

10. Gander RM, Thomas VL, Forland M: Manno-resistant hemagglutination and uropathogenic Escherichia coli isolated from adult patients, J Infect Dis 151: 508 (1985).

11. Johnson JR, Berrgren T: Pigeon and dove egg white protect mice against renal infection due to P fimbriated Escherichia coli, Am J Med Sci 307:335 (1994).

12. Baron EJ, Finegold SM: Microorganisms encountered in the urinary tract. "Baron EJ, Finegold SM (ed): Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology", P: 253, 8th Ed, Mosby Co, St Louis (1990).

13. Farmer III JJ, Kelly MK: Enterobacteriaceae. "Balows A, Hausler WJ, Herrmann KI, Isenberg HD, Shadomy HJ (ed): Manual of Clinical Microbiology", p:360, Fifth ed. ASM, Washington DC (1991).

14. Enerback S, Larson AC, Leffler H, Lundell A, De Man P, Nilsson B, Svanborg Eden C: Binding to galactosealfa 1-4 galactosebeta-containing receptors as potential diagnostic tool in urinary tract infection, J Clin Microbiol 25:407 (1987).

15. Feld LG: Urinary tract infections in childhood: Definition, pathogenesis, diagnosis, and management, Pharmacotherapy 11:326 (1991).

16. Israele V, Drabi A, McCracken GH: The role of bacterial virulence factors and Tamm-Horsfall protein in the pathogenesis of Escherichia coli urinary tract infection in infants, Am J Dis Child 141: 1230 (1987).

17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ: Protein measurement with folin phenol reagent, J Bio

- Chem 193:265 (1951).
18. Johnson JR, Ross AE: P1-antigen-containing avian egg whites as inhibitors of P adhesins among wild-type *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis, *Infect Immun* 61:4902 (1993).
19. Stapleton A, Moseley S, Stamm WE: Urovirulence determinants in *Escherichia coli* isolates causing first-episode and recurrent cystitis in women, *J Infect Dis* 163:773 (1991).
20. Olling S, Hanson A, Holmgren J, Jodal -U, Lincoln K, Lindberg U: The bactericidal effect of normal human serum on *Escherichia coli* strain from normals and from patient with urinary tract infections, *Infect* 1:24 (1973).
21. NCCLS: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Sixth Ed.; Approved Standart. NCCLS document M7 A6., NCCLS, Wayne, Table 2, M100-S7 (1997).
22. Jantausch BA, Wiedermann BL, Hull SI, Nowicki B, Getson PR, Rushton HG, Majd M, Luban NL, Rodriguez WJ: *Escherichia coli* virulence factors and 99mTc-dimercaptosuccinic acid renal scan in children with febrile urinary tract infection, *Pediatr Infect Dis J* 11:343 (1992).
23. Çakır N, Bahar H, Şaşmaz E, Karamızrak T, Okuyan M: Üropatojen *Escherichia coli* kökenlerinin hidrofobik özellikleri ve bunun hemaglutinasyon ve *Candida* aglutinasyonu ile ilişkisi, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 16:74 (1986).
24. Ayyıldız A, Balkan R, Babacan M: Erzurum yöresinde üropatojen *Escherichia coli* (UPEC) suşları, *Mikrobiyol Bül* 23:197 (1989).
25. Coşar G: Üropatojen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, hemoliz ve insan O grubu eritrositler ile hemaglutinasyon özellikleri, *İnfek Derg* 2:55 (1988).
26. Svenson S, Kallenius G, Möllby R, Hutberg H, Winberg J: Rapid identification of P-fimbriated *Escherichia coli* by a receptor-specific particle agglutination test, *Infection*, 10:209 (1982).
27. Hughes C, Hacker J, Roberts A, Goebel W: Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infection caused by *Escherichia coli*, *Infect Immun* 39:546 (1993).
28. Vaisanen-Rhen V, Elo J, Vaisanen E, Siitinen A, Ørskov I, Ørskov F, Svenson S B, Makela PH, Korhonen TK: P-fimbriated clones among uropathogenic *Escherichia coli* strains, *Infect Immun* 43:149 (1984).
29. Coşar G: Hemaglutination and filmbriae of *Escherichia coli* strains causing UTI and diarrhea, *Infek Derg* 3:55 (1989).
30. Karabiber N, Türet S : Üriner ve fekal kaynaklı *Escherichia coli* suşlarında mannoz rezistan hemaglutinasyon (RHA), tip 1 fimbria ve hemoliz yapma özelliklerinin araştırılması, *Mikrobiyol Bül* 26:12 (1992).
31. Johnson JR, Maslow JN, Fattlar DC, Adams KS, Arbeit RD: The role of bacterial adhesins in the outcome of childhood urinary tract infections, *AJDC* 147: 1090 (1993).
32. Foxman B Zhang L, Palın K, Tallan P, Marrs CF: Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection, *J Infect Dis* 171:1514 (1995).
33. Connell H, De Man P, Jodal U, Lincoln K, Svanborg C: Lack of association between hemolysin production and acute inflammation in human urinary tract infection, *Microbiol Pathogen* 14:463 (1993).
34. Arthur M, Johnson CE, Rubin RH, Arbeit RD, Campanelli C, Kim C, Steinbach S, Agarwal M, Wilkinson R, Goldstein R: Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun* 57:303 (1989).
35. Kallenius G, Möllby R, Svenson C, Helin I, Hutberg H, Cedergren B: Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections, *Lancet* ii:1369 (1981).
36. Marild S, Wettergren B, Hellström M, Jodal U, Lincoln K, Ørskov I, Ørskov F, Svanborg Eden C: Bacterial virulence and inflammatory response in infants with febrile urinary tract infection or screening bacteriuria, *J Pediatr* 112:348 (1988).
37. Arthur M, Arbeit RD, Kim C, Beltran P, Crowe H, Steinbach S, Campanelli C, Wilson RA, Selander RK, Goldstein R: Restriction fragment length polymorphism among uropathogenic *Escherichia coli* isolates: pap related sequences compared with *rrn* operon, *Infect Immun* 58:471 (1990).
38. Domingue GJ, Roberts JA, Laucirica C, Ratner MH, Bell DP, Suarez GM, Kallenius G, Svenson S: Pathogenic significance of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections, *J Urol* 133:983 (1985).
39. Stenqvist K, Sandberg T, Lindin-Janson G, Ørskov F, Ørskov I, Svanborg Eden C: Virulence factors of *Escherichia coli* in urinary isolates from pregnant women, *J Infect Dis* 156:870 (1987).
40. Latham RH, Stamm WE: Role of fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections in adult women: Correlation with localization studies, *J Infect Dis* 149: 835 (1984).