49056

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SUBİNHİBİTÖR KONSANTRASYONDAKİ BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ÜROPATOJENİK *Escherichia coli*'NİN HEMAGLÜTİNASYONUNA VE EPİTEL HÜCRELERE İN VİTRO YAPIŞMASINA ETKİLERİ

Osman Birol ÖZGÜMÜŞ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20.8.1996
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 4.9.1996

Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr.Faruk AYDIN
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Murat ERTÜRK
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Asım ÖREN

Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Murat ERTÜRK

AĞUSTOS _, 1996
TRABZON

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

T49056

ÖNSÖZ

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimim ve tez hazırlığım süresince benden bigilerini, yardımlarını ve anlayışını esirgemeyen değerli bölüm başkanımız ve hocamız Doç. Dr. Murat ERTÜRK'e ;

Çalışmamın her aşamasında benden hiçbir yardımını, bilgisini ve danışmanlığını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Faruk AYDIN'a ;

Ayrıca tez hazırlığım süresince yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Ali Osman KILIÇ'a ;

Teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Osman Birol ÖZGÜMÜŞ

Trabzon, Ağustos 1996

KISALTMALAR

ACB : Antibody Coated Bacteria
AX : Amoksisilin
CNF : Cytotoxic Necrotizing Factor
CFA : Colonization Factor Antigen
CS : Cell Surface
E.coli : *Escherichia coli*
ES: Eritrosit Süspansiyonu
GCF : General Colonization Factor
HA : Hemaglütinasyon
İYE : İdrar Yolu İnfeksiyonu
kbp : kilobase pair
MHA : Mueller Hinton Agar
MAC : Minimum Antibiotic Concentration
MIC : Minimal Inhibition Concentration
MS+: Mannoz-sensitif adhesin
MSHA : Mannoz Sensitif Hemaglütinasyon
MR+: Mannoz-rezistant adhesin
MRSA : Mannoz Rezistant Hemaglütinasyon
Pap . Pyelonephritis associated pilus
PBS : Phosphate Buffer Saline
pI : Protein İzoelektrik Noktası
RBC : Red Blood Cells
sIgA : Secretory Immunoglobulin A
TRM-SXT : Trimetoprim sulfametoksazol
TSB : Trypticase Soy Broth
UPEC : Üropatojenik *E. coli*
5 ve or.ref. : 5 ve oradaki referanslar

İÇİNDEKİLER

1-GİRİŞ VE AMAÇ.....1
2- GENEL BİLGİLER.....3
2.1-Tarihçe 3
2.2-Genel Özellikler 3
2.3-Kommensal ve Patojenik *E. coli* 3
2.4-*E. coli* Adhesinlerinin Terminolojisi ve Sınıflaması 4
2.5-*E. coli*'lerin Adhesiv Özellikleri 6
2.5.1-HA Aktiviteleri 6
2.5.2-Epitel Hücrelere Adezyon 8
2.5.2.1-Üropatojenik Suşların Epitel Hücrelere Adhezyonu 8
2.6-Adhesin-Reseptör İlişkileri 9
2.6.1-Tip 1 Fimbria Reseptörleri 9
2.6.2-UPEC'nin Mannoz Rezistant Adhesin Reseptörleri 10
2.7-Fimbriaların Strüktürü 12
2.7.1-Fimbriaların Kimyasal Özellikleri 12
2.7.2-Fimbriaların Primer Strüktürü 12
2.7.3-Fimbriaların Ultrastrüktürü 13
2.8-Fimbrial Genetik 13
2.8.1-Tip 1 Fimbrial Genetik 13
2.8.2-İYE'larıyla İlişkili Fimbrial Genetik 13
2.8.2.1-Pap Fimbria 14
2.8.2.2-$F7_2$ Fimbrial Genetik 14
2.8.2.3-IA2 Fimbrial Genetik 14
2.9-Fimbrial Biyogenez 14
2.9.1-Pap Polipeptitlerinin Fonksiyonları 14
2.9.2-$F7_2$ Polipeptitlerinin Fonksiyonları 15
2.10-Üreme Ortamlarının Adhesin Üretimine Etkileri 15
2.10.1-Sub-MIC'de Antibiyotiklerin Adherens Üzerine Etkileri 16
3-MATERYAL VE METOD 19
3.1-MATERYAL 19
3.1.1-Bakteriyal Suşlar 19
3.1.2-Kullanılan Gereçler.....19
3.1.3-Fimbriasyon İçin Kullanılan Besiyeri.....19
3.1.4-Deneylerde Kullanılan Tampon Solüsyon.....19
3.1.5-Deneylerde Kullanılan Maya Hücreleri.....20

3.1.6-Eritrosit Süspansiyonu.....20
3.1.7-Antibiyotikler ve Stok Solüsyonları.....20
3.1.8-Epitel Hücreler 20
3.2-METOD.....20
3.2.1-Bakteriyal Suşların İzolasyonu ve Saklanması.....20
3.2.2-Bakterilerin Fimbriasyonu 21
3.2.3-Bakteri Solüsyonlarının Hazırlanması.....21
3.2.4-Maya Solüsyonlarının Hazırlanması 21
3.2.5-Maya Aglütinasyonlarının Yapılışı 21
3.2.6-MIC Belirlenmesi 22
3.2.7-%2'lik ES'nun Hazırlanması.....22
3.2.8-HA Aktivitelerinin Belirlenmesi.....22
3.2.8.1-Lam Üzerinde HA Aktivitelerinin Belirlenmesi.....22
3.2.8.2-Mikrotitre HA Deneylerinin Yapılması.....23
3.2.9-Epitel Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması.....23
3.2.10-Sub-MIC'lerdeki Adherens Aktivitelerinin Belirlenmesi.23
3.2.11-İstatistiksel Metod.....24
4-BULGULAR.....25
4.1-MIC'ler.....25
4.2-Lam HA ve Mikrotitre HA Deneyleri.....25
4.3-Sub-MIC'lerin in vitro Adherense Etkileri.....28
5-TARTIŞMA.....30
6-SONUÇ VE ÖNERİLER.....34
7-ÖZET.....36
8-SUMMARY.....37
9-KAYNAKLAR.....38

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çoğunlukla infeksiyon, mukozal yüzeylerin bakterilerin kolonizasyonuyla başlatılan işlemler zinciri olduğu bilinmektedir.Doku invazyonu veya zararı, kuvvetli olasılıkla bakterilerin konak mukozasının epitel hücrelerine adherensiyle başladığına inanılmaktadır.Organizmaların epitel hücrelere adherens yeteneğinin gram negatif bakterilerde fimbria veya pili adı verilen yüzey yapılarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur.Birçok antibiyotiğin sub-MIC'lerinin bakterilerin yüzeylerinde modifikasyonlara neden olduğu ve böylece, onların konak hücre yüzeylerine adherens yeteneklerinin değiştirildiği ortaya konulmuştur (53).

Hemaglütinasyon tekniklerinin bakteriyal yapışmanın anlaşılmasında uygun bir metod olduğu ve bakteriyal pililerin adherense olduğu kadar, hemaglütinasyona da aracılık ettiği önerilmektedir (48).Çalışmamızda, elimizdeki klinik orijinli, İYE'larından izole edilmiş *E.coli* suşlarının subinhibitör konsantrasyondaki 3 antibiyotikle karşılaştıktan sonra HA'nı ve adherens yeteneklerindeki değişiklikleri belirleyebilmek için, hem insan eritrositleri kullanılarak yapılan HA hem de insan yanak mukoza epiteli hücreleri kullanılarak adherens aktivitelerini inceledik. Böylece, antibiyotiğin HA ve adherens aktivitelerine olan etkileri yanında bu özelliklerini ortaya koyabilmemiz için araştırmamızda kullandığımız HA tekniklerini kendi arasında karşılaştırma fırsatı bulduk.

E.coli, genelde insan üriner sisteminden en sık izole edilen mikroorganizmadır. Üroepitel hücrelere yapışabilmesi ve ürogenital mukozaya kolonize olabilmesi UPEC suşlarının en önemli virulans faktörüdür. UPEC suşlarındaki mannoz-rezistant adhesinler bu suşlara in vitro olarak epitel hücrelere yapışabilme yeteneği kazandırır. Birçok araştırıcı sub-MIC'lerin UPEC'in mannoz-rezistant adhesinlerine zarar vererek HA yeteneği ve epitel hücrelere yapışma yeteneğini azalttığını rapor etmişlerdir (51,52,53).

Subinhibitör konsantrasyondaki değişik aminoglikozidlerin ve diğer protein sentez inhibitörlerinin , adherensi azalttığı rapor edilmiştir (45).Bu bilgiler ışığında son günlerde yeni kullanıma girmeye başlayan bir karbapenem antibiyotik olan meropenemi, suşların HA aktivitesini ve epitel hücrelere in vitro yapışmasını ne derece azalttığını anlamak için, bu özellikleri bilinen biri aminoglikozid olan gentamisin, diğeri protein sentezine etkili bir antibiyotik olan tetrasiklinin etkileri kontrol olarak kullanılıp karşılaştırmalı olarak test edilmiştir.

Bu antibiyotiğin HA'da ve in vitro adherenste veya her ikisinde de aynı veya yakın oranlarda azalmaya neden olup olmadığını kontrol antibiyotiklerin etkileriyle karşılaştırarak, "İYE'larının tedavisinde de kullanılabilen bu antibiyotiğin geniş spektrumlu bir antibakteriyel olmasının tedavide bir avantaj sağlaması yanında şayet,

subletal dozlarda da kullanımıyla İYE'larından yüksek sıklıkla izole edilen *E. coli*'nin fimbria vasıtasıyla yaptığı adherensini azalttığı kanısına varılırsa, profilaksi amacıyla da kullanılabilir mi" sorusu cevaplamaktan çok, sadece "meropenem ve profilaksi" konusu belki de gündeme getirilebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

1855'te Escherich adlı araştırıcı "*Bacterium coli commune*" adını verdiği bir organizmayı infantların dışkısından izole etmiştir.*Bacterium coli* ismi sonradan yıllarca kullanılmıştır.Ancak 1920 de Castellani ve Chalmers adlı araştırıcılar Escherichia cinsinin günümüzde bilinen biyokimyasal reaksiyonlarını tanımlamıştır (1).

1946 da Taylor ve 1950 lerde Washington'daki bir grup araştırıcı (2) bu organizmanın toplam kompozisyonunun kayda değer ölçümlerini yapmışlardır. Hem hücresel yapıların izolasyonunda hem de hücresel moleküllerin kompleks karışımlarının anlaşılmasında ilerlemeler yapılmıştır.Bu araştırmalar gaz kromatografisi, yüksek basınç likit kromatografisi ve iki boyutlu jel elektroforezi kullanılarak yapılmıştır(3).

2.2. Genel Özellikler

Escherichia cinsi düz çubuk şeklinde, 1.1-1.5μm ile 2.0-6.0μm boyutlarında, tekli veya çift şekilde olan basilleri içermektedir.Birçok suşta kapsül veya mikrokapsül bulunmaktadır.Gram negatiftir.Peritriş flajellalar vasıtasıyla hareketli veya hareketsizdir.Fakültatif anaerobtur.Metabolizmaları hem respirator hem de fermentatif olup kemoorganotropiktir.Optimal üreme sıcaklığı 37°C dir.D-glukoz ve diğer karbohidratları asit ve gaz oluşturarak parçalar.Oksidaz negatif, katalaz pozitif, metil red pozitif, Voges-Proskauer negatif ve genelde sitrat negatiftir.H_2S, üre hidrolizi ve lipaz açısından negatiftir.Escherichia türleri nitratları indirger(4).

2.3. Kommensal ve Patojenik *E. coli*

E. coli hem insanda hem de birçok hayvanın barsak sisteminde normalde bulunan bir flora elemanı olarak tarif edilmiştir.Fakat ,barsak içi ve barsak dışı patolojilerde geniş bir etiyolojik ajandır.Kommensal *E. coli* suşları kalın barsakta bulunur. Prensipte her hayvan türü kendi serotipleriyle nitelendirilmesine rağmen, bazı serotipler çoğunda ortaya çıkmaktadır.Patojenik *E. coli* suşları kommensal suşların yaşayamadığı yerlere kolonize olabilmeleriyle birbirinden ayrılabilmektedir.Kommensal suşlar gibi patojenik suşlar da konağa spesifiktir.Çok sayıda farklı serotip olmasına rağmen,yalnızca sınırlı sayıdaki serotipler insan ve evcil hayvanlarda patoloji oluşturmaktadır(5 ve or.ref.,6,7).

Patojenik *E.coli*, klinik ve patolojik özelliklerine göre; enterotoksijenik *E.coli* (ETEC), enteroinvaziv *E.coli* (EIEC), enteropatojenik *E.coli* (EPEC), enterohemorajik *E.coli* (EHEC) ve enteroagregatif *E.coli* (EAggEC) olmak üzere 5 sınıfta toplanmıştır(8,9).

ETEC, ısıya hassas ve ısıya dayanıklı toksin üretir.Bu toksinler, *Ent* plazmiti denilen plazmidlerce kodlanır. *Ent* plazmidlerin stabilitesi sıcaklık veya besiortamından etkilenmektedir (10).

EIEC, kolonda çoğalarak epitel hücrelere yayılır ve dizanteriye benzer hastalık oluşturur.En önemli virulans faktörü yayılım yetenekleridir.Toksin üretmezler(5).

EPEC, ince barsağa yerleşir ve toksin üretir. Salmonella benzeri hastalık yapar.Bu yüzden enterotoksemik olarak da bilinir(5).

Bazı *E.coli* tipleri, Shigella benzeri toksin üretir ve hemorajik kolite neden olur.Bu tip *E.coli*'ler EHEC olarak sınıflandırılır.Hemorajik kolite genelde O157:H7 serotipi neden olur.Ürettiği toksine; Shigella toksinine benzediğinden Shiga-like toksin; Vero hücrelerine (yeşil maymun böbrek hücresi) toksik etki gösterdiğinden Vero-toksin de denilmektedir (11). Shiga-like toksin üreten *E.coli*, özellikle 5 yaşın altındaki ve daha büyük çocuklarda Hemolitik Üremik Sendrom denilen hastalıktan sorumludur.Bu hastalık, klasik tip olarak bilinir. Mikroanjiopatik hemolitik anemi, trombositopeni ve akut böbrek yetmezliğine yol açmaktadır (11-15).

Son günlerde tanımlanan EAggEC, memeli hücrelerine agregatif veya üst üste sıralanmış tuğla (stacked-brick) şeklini vermektedir.Güney ve Orta Amerika, Hindistan, Bangaldeş ve İngiltere'de yapılan çalışmalarda çocuklardaki diyare etkenlerinden birinin de EAggEC olduğu saptanmıştır (9).

Barsak dışı hastalıklarda *E. coli*; insanlarda İYE ,buzağılarda neonatal menenjit ve septisemik kolibasillozis gibi hastalıkların en iyi bilinen etiyolojik ajanıdır.Ayrıca gram negatif bakteriyemi, nozokomiyal infeksiyonlar, peritonit ve apendisit etkeni de olabilmektedir(5,7).

2.4. *E.coli* Adhesinlerinin Terminolojisi ve Sınıflaması

Adhesinler, bakteriyel hücrelerde bulunan makromoleküler yapılardır ve bir yüzeye yapışmaya aracılık ederler.Yapışma (=adhesion), bağlanma (=atthachment), yapışıklık (=adherence) terimleri, bakterilerle epitel hücrelerin glikokaliksinde veya mukozalarda bulunan reseptörler arasındaki etkileşimi göstermek için kullanılmaktadır (5 ve or.ref.).Adhesinlerin çoğu polimerik yapılardır ve protein altbirimlerinden oluşmuş, flagella yapısında olmayan filamentöz yapılar olarak tarif edilmişlerdir (5 ve or.ref.,16). Morfolojilerinin temelindeki bu filamentler, 1955'te Duguid ve ark. tarafından (5 ve or.ref.) fimbria, 1959'da Brinton tarafından (5 veor.ref.) pili olarak isimlendirilmiştir. Her iki terim de dilbilgisi açısından doğru ve sinonim olarak kullanılabilmektedir (5 ve or.ref.). Kommensal ve patojenik *E. coli* suşlarının büyük bir çoğunluğu tip 1 fimbria üretir ve *E. coli*'lerin genel fimbriyaları olarak tanımlanırlar (17). Bu fimbriyalar, 17.000 moleküler ağırlığında, tekrarlayan protein altbirimlerinden oluşmuştur.Tip 1 fimbria bu bakteri hücrelerine; birçok hayvan, bitki, mantar ve maya

hücrelerine bağlanabilme yeteneği kazandırır.Böylece, bu fimbrialara GCF denilmektedir (17,18).

Spesifik reseptörlerle fimbrialar arasındaki ilişki, reseptörlerin kimyasal yapılarıyla ilgili olarak tartışmalar yaratmıştır.Örneğin, adesinleri tanıyan mannoz rezidüleri (M fimbria) ya da bunları tanıyan sialik asitli karbohidratlar (S fimbria) .Bu sınıflama karışıktır.Çünkü, üropatojen suşlarla ilgili fimbrialar, kan grubu antijenlerini tanımasına göre sınıflandırılmıştır.P kan grubu antijenlerini tanıyan P fimbrialar, M antijenlerini tanıyan M fimbrialar gibi örnekler mevcuttur (5 ve or.ref.,19,20). *E.coli* adhesinleri, antijenik özelliklerine göre sınıflandırmıştır. Buna göre; O (lipopolisakkarit), K (kapsüler polisakkarit) ve H (flagella) antijenleridir(6,19).

Tablo 1.Enterotoksijenik suşların bazı fimbrial adhesinlerinin özellikleri.

Adhesin	**Altbirim moleküler ağırlık**	**Fimbria çapı (nm)**	**Konak**
Tip 1	17.00	7	
K88 (ab,ac,ad)	23.000-26.000	2.1	domuz
987 P	20.000	7	domuz
K99	18.500	5	dana,kuzu,domuz
F41	29.500	3.2	dana,kuzu,domuz
CFA I	15.000	7	insan
CFA II			
CS1	16.300	7	insan
CS2	15.300	7	insan
CS3	14.800	2	insan
CFA III	16.000	7	insan

Patojen *E. coli* suşlarının konağa spesifik fimbrial antijenleri farklıdır ve türe spesifiktir.Bu sınıflamaya göre; F2=CFA I, F3=CFA II, F4=K88, F5=K99, F6=987 P ve F7-12=Üropatojen suşlarda bulunan değişik fimbrialar olarak belirtilmektedir (5 ve or.ref.,20,21).Konağa spesifik adhesinlerin bazı özellikleri Tablo 1 ve 2'de özetlenmiştir(5 ve or.ref.).Enterotoksijenik suşlarda bulunan diğer bir adhesin, Isaacson ve Richter (5 ve or.ref.) 987P olarak isimlendirmiştir.Buzağı, kuzu veya domuzlardan izole edilmiş enterotoksijenik suşlardaki K99 adhesini, Wadström ve ark.(5 ve or.ref.) tarafından bulmuştur.CFA II olarak, CS1, CS2 ve CS3 (cell surface antigen) adında immünolojik olarak üç farklı antijen belirlenmiştir (22). Araştırıcı tarafından bu antijenler, CFA II antijeninin varlığını ortaya çıkarmaya yönelik çalışmalarda bulunmuştur (5 ve or.ref.).UPEC suşlarının bazı fimbrial adhesinleri izole

edilmiş ve sınıflandırılmıştır.*E.coli*'nin 3048 suşu (serotip O4:K3) ve 3669 suşu (serotip O2:K5:H1) P fimbriaları, 19.500 moleküler ağırlığındaki protein altbirimlerinden oluşmaktadır.Globoseri glikolipitlerini tanıyan bu fimbrialara ek olarak, 3048 suşu, tip 1 fimbria üretmektedir (5 ve or.ref.,6,16,18,23-25).

Tablo.2. Üropatojen suşların bazı fimbrial adhesinlerinin özellikleri.

Adhesin	**Altbirim moleküler ağırlık**	**Fimbria çapı (nm)**	**Konak**
Tip 1	17.000	5-7	insan
F7 (1,2)	22.000	5-7	insan
F9	19.500	5-7	insan
F12	18.200	5-7	insan
KS 71A	21.300	5-7	insan
KS 71C	16.600	5-7	insan
ER 2B2	16.200	5-7	insan

Saflaştırılmış P fimbria, 5-7 nm çapındadır ve 3669 suşunun P fimbrialarına F9 antijeni denilmektedir.F12 antijeni olarak isimlendirilen diğer bir P fimbria tipi, C1979 suşu (serotip O6:K2:H1) ndan izole edilip saflaştırılmıştır.F7 fimbrial antijeni 22.000 Da. altbirimden oluşmaktadır. Bu suş, tip 1' e benzer fimbria olan 1C üretmektedir.Genellikle üropatojen suşlar, tip 1 fimbriaya ek olarak, iki veya üç tip fimbria oluştururlar. KS71 ve ER2 suşlarının fimbriaları Tablo 2'de sınıflandırılmıştır.Bütün bu fimbrialar 5-7 nm çapında olup, aminoasit kompozisyonlarına göre birbirleriyle yakından ilişkilidir (5 ve or.ref.).Son zamanlarda neonatal sepsis ve menenjitle ilişkili suşlardan izole edilmiş, farklı tipte bir fimbria tarif edilmektedir.Bu fimbria, reseptör olarak sialilgalaktozitleri tanımaktadır.S fimbria olarak isimlendirilen bu fimbrialar, morfolojik olarak tip 1 ve P fimbrialara benzeyip, 17.000 moleküler ağırlıklı altbirimlerden oluşmuştur (6,26).

2.5. *E.coli*'lerin Adhesiv Özellikleri

2.5.1. HA Aktiviteleri

HA, bakterilerin adhesiv özelliklerinin, gözleme dayalı ilk kanıtıdır.Bu aktiviteye sahip birçok *E. coli* suşunda görülen bir olaydır.HA aktivitesi fimbria varlığıyla ilişkilidir.HA aktivitesinin gücünde farklılıklar olmasına rağmen, tip 1 fimbria taşıyan

E. coli suşları, farklı hayvan türlerinin eritrositleriyle aglütinasyon verebilmektedir(5 ve or.ref.).

Birçok *E. coli* suşunun HA aktivitesi D-mannoz ile durdurulabilmektedir.Bu olaya, mannoz sensitif hemaglütinasyon (MSHA) denilmektedir.Ayrıca, konağa spesifik adhesinler taşıyan patojenik *E. coli* suşları, mannoz sensitif olmayan bir rolle eritrositleri aglütine edebilmektedir.Bu tip HA'a, mannoz rezistant hemaglütinasyon (MRHA) denilmektedir.Suşlar, 37°C de üretilirse HA meydana gelmekte, 18°C'de oluşmamaktadır. MRHA deneyi 3-5°C de yapılmalıdır.Çünkü, aglütinasyon karışımının sıcaklığının artması, bakterilerin aglütine edilmiş eritrositlerden kurtulmasını kolaylaştırmaktadır (27-29).Bu suşların çoğu, tip 1 fimbriaya bağlı MSHA göstermektedir.Suşların yarısı da uygun şartlarda üretilip test edilirse, MRHA göstermektedir.Sınırlı sayıdaki suşlar, yalnızca mannoz rezistant hemaglütininler taşımaktadır (17).Bazı suşların birden fazla hemaglütinin üretme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir.Hemaglütininlerin farklı tipleri, gelişimleri için değişik kültürel şartlara ve eritrosit tiplerine ihtiyaç göstermektedir.Mannoz rezistant hemaglütininler, genelde fimbria olarak tarif edilmesine rağmen, bazı *E. coli* suşları, fimbriyal olmayan hemaglütininler de üretebilmektedir (5 ve or.ref.).

Mannoz rezistant hemaglütininlerin belli tiplerinden birini taşıyan *E. coli* suşları, sınırlı sayıdaki eritrosit türlerine bağlanabildiğinden dolayı, insan kaynaklı *E. coli* suşlarının tiplendirilmesi için, HA önerilmektedir.Bununla beraber, adhesinlerin belli tipleri, yalnızca bazı eritrosit tiplerini aglütine edebilmesine rağmen, bu çeşit HA modeli, her zaman değişik adhesinleri belirlemede kullanılamamaktadır.Benzer HA örnekleri, CFA I taşıyan insan suşlarıyla da gösterilmiştir. Bazı özel HA aktiviteleri, farklı hayvanların eritrositleriyle değişiklik göstermektedir. CFA II ile oluşturulmuş reaksiyon, sığır eritrositlerinin bazı spesifik kan grup antijenleriyle sınırlı kalmaktadır.Tip 1 fimbria taşıyan suşların adhesiv özelliklerini göstermek için, aglütinasyonda eritrositlerin kullanılması yerine, yüzeylerinde mannanlar bulunduran maya hücrelerini kullanabiliriz.Maya aglütinasyonu, mannoza duyarlı adhesinler açısından, bakteriyal izolatları araştırmada kullanılabilmektedir.Eritrosit ve maya hücrelerinin aglütinasyonu, hücre-yüzey adhesinlerinin varlığını gösterdiği kabul edilmesine rağmen, hücre-yüzey komponentlerinin eritrositler ve maya hücrelerinde bulunup bulunmadığı bir sorun olarak kalmıştır. Belirli bir *E. coli* suşunun eritrosit ve maya hücrelerini aglütine etme yeteneği ile, bu suşların farklı türdeki memeli hücrelerine yapışma kapasiteleri arasında fazla bir korelasyon olmadığı sanılmaktadır.Bakterilerin ökaryotik hücrelere yapışması kompleks bir olaydır. Sadece belirli bir üreme ortamındaki bazı suşlar tarafından oluşturulan adhesinin tipine değil, ökaryotik hücrelerde bulunan bir seri farklı reseptör yapılarına da bağlıdır (5 ve or. ref.).

2.5.2. Epitel Hücrelere Adhezyon

İnfeksiyonda *E.coli*, glikokaliks denilen epitel hücre yüzeylerinde veya goblet hücreleri denilen özelleşmiş hücrelerden salınan glikoproteinlerden oluşmuş, mukus tabakalarda bulunan glikolipitlere veya glikoproteinlere yapışır.Bu mukus jel, bakterilerin epitel hücrelere girişini engelleyen ekstra bir bariyer oluşturur.Yalnızca tip 1 fimbria taşıyan suşların mukus jele yapıştığına inanılmaktadir.Enterotoksijenik veya üropatojenik suşlarda, ya pasif ya da aktif olarak mukusa olan penetrasyon desteklenmektedir.Böylece fırçamsı epitel hücrelere yapışmaktadırlar.Bakterilerle fırçamsı epitel hücreleri arasındaki güçlü ilişki, sonradan bakteriyi yüzeyden uzaklaştırmayı önlemektedir.Mukus jelde veya tükrükte bulunan glikoproteinler,glikolipitlerle fırçamsı epitellerdeki glikoproteinlerin reseptör özelliklerini ortak olarak paylaşabilmektedir(5).

2.5.2.1. Üropatojenik Suşların Epitel Hücrelere Adhezyonu

İYE'na neden olan *E.coli* suşları, genellikle dışkıdan orijin almaktadır (7,23-28). Bakteriler, dış genital bölgeye kolonize olduktan sonra İYE, zayıf veya farkedilmeyen asemptomatik bakteriüriden semptomatik infeksiyonlara kadar; konağın hassasiyetine ve yayılan suşun virulans faktörlerine bağlı olarak akut sistit veya piyelonefrit olarak ortaya çıkmaktadır (27-31). Yalnızca bazı O:K:H serotiplerine sistit ve piyelonefritte rastlanır.Bu suşlar, insan üriner sistemi için özel patojeniteye sahiptir.Ayrıca, piyelonefritten izole edilen bu suşlar, hemolizin ve aerobaktin üretmektedir.Kapsüllü olmakla beraber, serum rezistanttır(30-37). İYE'lu hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarının birçoğu adhesiv özellikler gösterir ve üroepitelyal hücrelere yapışabilme kapasiteleri, üriner sisteme kolonize olan fekal *E.coli* suşlarını belirleyen önemli bir faktör olarak bilinmektedir (35,36-42). Genellikle, İYE'larından izole edilen suşların adhesiv özelliği, fekal izolatlardan daha güçlüdür (24,31,34). In vitro adhezyon, kişilerle adhezyon molekülleri arasında ve epitel hücrelerin canlılığı, ürediği medyum, üreme fazı, kullanılan epitel hücrelerin bakterilere oranı ve adhezyon testinin inkübasyon şartları ile değişmektedir (5 ve or.ref.).

Konağın bazı predispozan faktörleri, üropatojenik suşların kolonizasyonunda önemli bir role sahiptir.Bu suşlar,rekürrent İYE'lu kadın veya kızların üroepitel hücrelerine daha kolay bağlanır.Bağlanma kapasiteleri hiçbir bakteriüri hikayesi bulunmayan kontrol kişilerden izole edilen hücrelere nazaran daha hızlı olur (16,23,31). Rekürrent infeksiyonların çoğu dışkıdan bakterilerin yeniden girmesiyle başlatılır (23,34).

1981'de Hagberg ve ark.(5 ve or.ref.) geniş bir UPEC kolleksiyonunun insan üroepitelyal hücrelere yapışma ve insan eritrositleri ile maya hücrelerini aglütine etme kapasitelerini araştırmışlardır.Üç önemli adhesiv özellik bulmuşlardır:

1-MSHA ve MRHA gösteren suşlar, fazla miktarda üroepitelyal hücrelere yapışmıştır.

2-Yalnızca MSHA gösteren suşlar az miktarda üroepitelyal hücrelere yapışmıştır.

3-Aglütinasyon kapasitesine sahip olmayan suşlar üroepitelyal hücrelere bağlanamamıştır.

Mannoz rezistant adhezinler üreten suşlar, yüksek miktarda yapışmaktadır ve akut piyelonefritlerden izole edilen suşlarda yüksek miktarda bulunmaktadır.Bu gözlemler tip 1 fimbrianın semptomatik İYE'larının oluşmasında daha az önemli olabileceğini ortaya çıkarmaktadır (29,32,39). Bu adhesinleri taşıyan suşlar, fekal floraya hakimdir.Barsakta mannoz rezistant adhezin taşıyan suşların oradaki ısrarlı kalıcılığı, piyelonefritin sonraki atakları açısından bir tehtid yaratmaktadır (7,23,24,34).

Tip 1 fimbrialı UPEC, üriner glikoproteinde (Tamm-Horsfall glikoproteini) hapsedilebilir.Tamm-Horsfall glikoproteini, mannoz rezidüleri açısından zengindir.Böylece, üriner sistemdeki tip 1 fimbria için reseptör olarak görev yapar (18,27,28).

Mukus üretimi, immünolojik olmayan, antibakteriyel konak savunma mekanizmalarının önemli bir işlemidir (5).

Tip 1 fimbriaya sahip *E.coli* suşları, saflaştırılmış Tamm-Horsfall glikoproteinine yapışabilmektedir.Tip 1 fimbrianın tersine, üropatojen suşlarda bulunan mannoz rezistant adhesinler, bu suşların üroepitelyal hücrelere yapışmasını artırmaktadır (23,24) Bu adhesinlere karşı oluşmuş antikorlar, bu suşların üroepitellere yapışmasını önlemektedir (38,41). Ayrıca, saflaştırılmış mannoz rezistant adhesinler, spesifik olarak insan üroepitelyal hücrelerine bağlanabilmektedir (5 ve or.ref.).

Sonuçta UPEC suşları, farklı kombinasyonda fimbrial adhesinler üretirler.Hedef hücrelerdeki değişik reseptörlerin dağılımıyla birlikte, üretilen bu adhesinler,bakterinin belirli bir dokuya yapışma özelliğini belirlemektedir.Bağlanma, yalnızca uygun adhesin ve reseptör bulunduğu zaman ortaya çıkmaktadır (5 ve or.ref.).

2.6. Adhesin-Reseptör İlişkileri

2.6.1. Tip 1 Fimbria Reseptörleri

E.coli'nin fimbrial adhesinlerini tanıyan, memeli hücre yüzeyi komponentlerinin yapısıyla ilgili ilk bulgular, değişik maddelerin bu bakterilerin adhesiv kapasiteleri ve HA yetenekleri üzerine yapılan inhibitör aktivitesi çalışmalarından elde edilmiştir.*E.coli*'nin HA aktivitesi üzerine değişik karbohidratların etkileri araştırılmıştır (5 ve or.ref.). Tavuk eritrositlerinin HA'nunda D-mannozun güçlü bir inhibitör etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.Birçok farklı şekerin hemaglütinasyon aktivitesi üzerine az ya da hiçbir etki göstermediği bulunmuştur.Daha sonraki raporlarda D-mannoz veya α-D-mannosidin hem tavuk hem de guinea-pig eritrositlerinin HA'nu üzerine güçlü bir inhibitör etki yaptığı açıklanmıştır (20,31,32). HA aktivitesinin tip 1 fimbrianın

varlığıyla ilişkili olduğu bulunmuş ve bu fimbriayla oluşturulan HA üzerine D-mannoz ve metil-α-D-mannozitin inhibitör etkileri doğrulanmıştır (5 ve or.ref.). Tip 1 fimbria reseptörlerinin yapıları hem eritrositler hem de epitel hücreleri kullanılarak çalışılmıştır.Tip 1 fimbrialı bakterilerin epitel hücrelere yapışması in vitro olarak gösterilmiş ve *E.coli*'nin izole edilmiş insan yanağı mukoza hücrelerine bağlanması açıklanmıştır.Eritrosit ve epitel hücrelerin her ikisine birden yapışma, tip 1fimbria olarak belirlenmiş aynı "mannoz-spesifik" adhesinlerle oluşmaktadır.Maya hücresi aglütinasyonu kullanılanarak değişik lineer ve dallanmış oligosakkaritlerin, hatta D-mannoz rezidüleri içeren glikozidlerin inhibitör etkileri test edilmiştir.Lineer disakkaritler, tetrasakkaritler ve pentasakkaritler zayıf inhibitörlerdir.Genelde mannoz spesifik adhesinler, tercihen kısa oligosakkaritlere bağlanmaktadır.*E.coli* tip 1 fimbriası ile ilgili çalışma sonuçları bir trisakkariti tanıyan uzamış bir bağlanma yeri bulunduğunu göstermektedir.Bu bölge büyük olasılıkla hidrofobiktir. Mannoz içeren glikokonjugatlar, birçok memeli hücre yüzeyinde bulunduğu için tip 1 fimbrianın mannoz spesifikliği, bu adhesini taşıyan bakterilerin ökaryot hücrelere yapışabilmesini sağlamaktadır.Diğer bir yönden tip 1 fimbrialarla mannoz içeren reseptörler arasındaki ilişki, *E.coli*'nin yalnızca belirli epitelleri seçerek kolonize olmasını açıklamaz.Tip 1 fimbria üretimini, hatta memeli hücre özelliklerini etkileyen çevrenin fizyolojik şartları selektif yapışmanın önemli bir nedenidir.Enterobacteriaceae'ye ait farklı cinslerden izole edilen tip 1 fimbria, mannoz sensitif fimbrial adhesinlerin bir ailesi olarak sınıflandırılabilir (5 ve or.ref.). Belirli bir genustaki tüm suşlar aynı oligosakkarit spesifikliğine sahip olmasına rağmen, farklı genusların tip 1 fimbriaları mannoz içeren oligosakkaritlere bağlanmada farklılıklar gösterir.Bu gözlem Enterobacteriaceae'ler arasında farklı sınıflarda tip 1 fimbria varlığını göstermektedir (5 ve or.ref.). Örneğin solunum yolundan izole edilen çeşitli enterik bakteri suşları arasında tip 1 , tip 3 ve P fimbria'nın varlığını gösteren çalışmalar vardır (42).

2.6.2. Üropatojenik Suşların Mannoz Rezistant Adhesin Reseptörleri

Mannoz rezistant adhesinler taşıyan *E. coli* suşlarının insan epitel hücreleriyle spesifik etkileşimleri, epitel hücrelerde spesifik reseptörlerin olduğunu göstermektedir.Bu hücrelerden elde edilen bir glikolipid fraksiyonunun *E. coli* hücrelerinin yapışmasını önlediği bulunmuştur (5 ve or.ref.) Bu fraksiyon, mannoz rezistant adhesinler için reseptör olarak görev yapan ve globoseri glikolipitleri olarak bilinen, glikosfingolipitlerin özel bir sınıfını içermektedir (16,18). Üroepitel hücrelerden elde edilen en etkili glikolipit, globotetraosilseramittir (=globosit).Fakat globotriaosilseramid de reseptör aktivitesi gösterir. Her iki glikolipitin *E. coli*'nin üroepitelyal hücrelere adhezyonunu önlemedeki aktivitesi, aynı yapıda ama farklı kaynaklardan izole edilmiş glikolipit modelleriyle doğrulanmıştır (5).

Globoseri glikolipitleri normal P_1 ve P_2 fenotipli insan eritrositlerinde bulunmaktadır.Nadir rastlanan p fenotipli kan grubuna sahip kişilerin eritrositleri ise bu glikolipitlerden yoksundur.Çünkü, terminal galaktozil rezidülerini laktosilseramide ekleyen galaktoziltransferaz enzimine sahip değildirler (16).

P kan grubunun glikolipitlerini tanıyan mannoz rezistant adhesinlere P fimbria denilmiştir(5,18). Yalnızca P fimbria taşıyan *E.coli* suşlarıyla normalde etkileşime girmeyen guinea-pig eritrositleri, izole edilmiş globositlerle kaplanabilmektedir.Böylece P fimbriaya sahip suşlarla bu eritrositlerin arasında spesifik bir aglütinasyon oluşur (5 ve or.ref.).

Üroepitelyal hücrelere bağlanan suşların büyük bir kısmı, globotetraosilseramite bağlanabilmektedir.Globositin tanınması özellikle piyelonefrite sebep olan suşlar arasında sıktır (43).

Globoseri glikolipitleri, üroepitel hücreler dahil olmak üzere birçok tipteki insan hücrelerinde bulunduğundan dolayı, piyelonefrite sebep olan suşların P kan grubuna sahip olan ve olmayan kişilerden izole edilmiş insan üroepitelyal hücrelere bağlanması araştırılmıştır.P kan grubu antijenlerinden yoksun kişilerden elde edilen üroepitel hücreler, P_1 veya P_2 fenotipli kişilerden elde edilen hücrelere nazaran piyelonefritik suşlara daha az ölçüde yapıştığı sonucuna varılmıştır (40,44).Eritrosit ve epitel hücrelerinde globositler bulunmayan p fenotipli kişiler, P fimbriya taşıyan suşların neden olduğu İYE'larına karşı hassas değildirler (5 ve or. ref.). Bazı piyelonefritojenik suşlar, X spesifikliği olarak bilinen, insan eritrositlerindeki farklı bir yapıyı tanımaktadır (38,45). P ve X fimbrialar aynı suşta bulunabilmektedir.Fakat, bazı suşlar yalnızca X fimbria bulundurur.P fimbria, genç hastalardan soyutlanan suşlar veya birkaç kere İYE geçiren kişiler arasında çok daha sık ortaya çıkmaktadır.Oysa X fimbrialar yaşa veya İYE geçirme sayısına bakmaksızın eşit oranda ortaya çıkmaktadır(5 ve or.ref.). Nowicki ve ark.(40) sistiti olan İsveç'li hastalardan soyutlanan *E.coli* suşları arasında, asemptomatik bakteriürili veya piyelonefritli hastalarınkine nazaran daha yüksek oranda Dr-pozitif izolatlar olduğunu bulmuşlardır.Dr hemaglütininleri mannoz varlığında hem P_1 hem de p fenotipli eritrositleri aglütine etmekte ve X adhesini olarak bilinmektedir(40,45). 1982'de Vaisanen ve ark.(5 ve or.ref.) akut piyelonefritli hastalardan soyutlanan X fimbrialı suşlardan biri M kan grubu spesifikliği göstermiştir.MM ve MN eritrositlerinin her ikisi ile güçlü bir aglütinasyon sağlanırken, NN eritrositleriyle zayıf veya hiç aglütinasyon gözlenmemiştir.Bu gözlemler, bazı suşların tip M glikoforin A olarak bilinen bir M kan grup antijenini tanıdığını ortaya koymaktadır.Glikoforin A'nın M ve N eritrositlerinden farkı, bu proteinin N-terminal aminoasit sırasını tanımasına bağlıdır.Bu sıra, tip M'de *Ser-Ser-Thr-Thr-Gly* ve tip N glikoforin A'da ise *Leu-Ser-Thr-Thr-Thr-Glu* şeklindedir(43).

2.7. Fimbriaların Strüktürü

2.7.1. Fimbriaların Kimyasal Özellikleri

Fimbriaların kimyasal analizleri, onların major bir polipeptit zincirinden meydana geldiğini göstermiştir.Minör bileşen olarak, bazen karbohidratlar veya fosfat bulunmaktadır. Tip 1 fimbria yaklaşık olarak, herbir altbiriminde azalan 1 şeker rezidüsü içerir.Bazı şekerlerin serin, treonin veya tirozin rezidüsü ile bağlı olduğu düşünülmektedir. Birçok fimbrial altbirim, 140-200 aminoasit rezidüsünden oluşmuştur.Fimbrialar, genellikle pI'sı 4-5 olan asidik proteinlerdir.Gözlemler, birçok fimbrianın 7 pH'da net bir negatif yüke sahip olduğunu düşündürmemektedir.Çünkü negatif yüklü olsaydı, ökaryotik hücrelerin negatif olarak yüklü yüzeyi fimbrianın yaklaşmasına izin vermezdi.Büyük olasılıkla, fimbrianın yük yoğunluğu çok düşüktür.Katyonlar, negatif yükü örtmektedir ya da fimbria ile ökaryotik hücre yüzeyleri arasında iyonik köprüler oluşmasını sağlamaktadır.Değişik *E.coli* suşlarından elde edilen tip 1 fimbrialar amino-asit kompozisyonlarında küçük farklılıklar gösterir. Bu da, primer yapıdaki küçük varyasyonları gösterir.Tip 1 fimbria ve İYE'yla ilişkili fimbriaların (İYE fimbriaları) aminoasit kompozisyonlarındaki benzerlik, bu proteinler arasında çok yakın bir evrimsel yakınlık olduğunu göstermektedir.Bunun tersine diyare hastalıklarıyla ilişkili fimbrialar, kendi aminoasit kompozisyonlarında daha heterojendirler (5 ve or.ref.).

2.7.2. Fimbriaların Primer Strüktürü

E.coli fimbriaları atasal genleri sayesinde fonksiyonel ve yapısal olarak yakından benzerlikler gösteren bir grup protein içerir.Çok sayıdaki protein altbirimlerinin primer yapısı kısmi veya tam olarak anlaşılmıştır.Özellikle fazla sayıdaki tip 1 ve P fimbriaların N-terminal sıraları belirlenmiştir.Farklı *E.coli* suşlarından elde edilmiş tip 1 fimbrial altbirimlerin N-terminal sıralarının karşılaştırılması, bu sıraların gerçekten eşit olduğunu açığa vurmaktadır(5).

Tip 1 ve P fimbrial altbirimlerin N-terminal sıraları karşılaştırılırsa, çok iyi saklanmış hidrofobik aminoasit rezidülerinden oluşmuş bir model görülebilmektedir.Hidrofilik rezidüler genellikle proteinlerin yüzeyinde oluşur ve böylece antikorlarlar tarafından kabul edilebilirler.Bunun tersine, hidrofobik aminoasit rezidüleri, genelde proreinlerin yüzeyinde açığa çıkmazlar.Bu sayede konağın immün sistemi ile ilişkiye girmezler.Bununla birlikte, hidrofobik aminoasit rezidüleri, prorein yüzeyinin korunmasynda önemli bir rol oynar ve çok iyi korunurlar.Böylece hidrofobik rezidülerin saklanması ve hidrofilik rezidülerin varyasyonu halen antijenik değişiklikler gösteren ortak bir yapının muhafazasını sağlayabilmektedir.Bu bilgilerin ışığında tip 1 ve P fimbrial altbirimlerin N-ucu muhtemelen fimbria yüzeyinde açığa çıkmaktadır (5 ve or.ref.).

2.7.3. Fimbriaların Ultrastrüktürü

Genellikle *E.coli* fimbriaları 2 morfolojik sınıf veya tipe ayrılabilirler.Bu tiplerden birini tip 1, 987P, CFA I, CS1, CS2 ve P fimbrialar temsil etmektedir.Bu fimbrialar, sert yapılı olup, yaklaşık 7 nm çapında ve belirgin bir aksial deliğe sahiptirler.İkinci morfolojik tipi, K88, K99, F41 ve CS3 fimbriaları temsil etmektedir.Bu fimbrialar esnek olup, 2-5 nm gibi ince bir çapa sahiptir.İnce ve esnek yapılarına dayanarak, bu fimbriaları "fimbril" veya "fimbriler" fimbrialar olarak isimlendirebiliriz (5 ve or.ref.).

"Fimbriaların bağlanma bölgelerinin fimbrianın ucu mu yoksa, değişik bağlanma yerleri mi" olduğu merak edilmiş ve Brinton'un yaptığı çalışmalarda (5 ve or. ref.).Tip 1 fimbrianın bağlanma yerinin fimbria ucu olduğu bulunmuştur.

Bütün adhesinler fimbria olarak sınıflandırılmayabilir.1981'de Eshdat ve ark.(5 ve or.ref.) İYE'lu bir vakadan izole ettikleri bir *E.coli* suşunun farklı karakterde tip 1 fimbria ürettiğini bulmuşlardır.Mannoz sensitif maya aglütinasyonunun yalnızca tip 1 fimbrialarla ilişkili olmadığı, fimbriasız hücrelerle de ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir ve dış membran vezikülleri izole etmişlerdir.Bu gözlemler, fimbrial altbirim monomerlerinin fimbriayla polimerizasyon yapmadan dış membrana girdiğini veya diğer mannoz sensitif adhesinlerin bu membranlarda bulunduğunu göstermişlerdir.

2.8. Fimbrial Genetik

2.8.1. Tip 1 Fimbrial Genetik

Orndorff ve Falkow (5 ve or.ref.) yaptıkları çalışmalarda tip 1 fimbria üretimiyle ilişkili 5 polipeptidin kodlandığını belirtmişlerdir.Bu polipeptitlerden üçü (p17, p86 ve p30) fimbrianın toplanmasında (assembly) görev almaktadır.Dördüncü polipeptit olan p23, fimbria ekspresyonunun regülasyonuna katılmaktadır.Beşinci polipeptid olan p14'ün fonksiyonu bulunmamıştır.Fakat bu polipeptidin tip 1 fimbriayla ilişkili olduğu veya immünolojik olarak tip 1 fimbria altbirimleriyle çapraz reaksiyon verdiği sonucuna varılmıştır.

2.8.2. Üriner Sistem İnfeksiyonlarıyla İlişkili Fimbrial Genetik

Diyare hastalıklarıyla ilişkili bazı fimbriaların muhtelif plazmidlerce kodlanmalarının tersine, İYE'larıyla ilişkili fimbriaları kodlayan genler, bakteriyel kromozomlarda kodlanmaktadır.Bu fimbriaların analizleri, üropatojenik suşların dörtten fazla farklı fimbria üretmesi yüzünden karmaşıktır.Bazıları serolojik olarak benzerdir ve aynı reseptörü tanımaktadır.Fimbria üretimi hususunda üropatojenik suşların değişkenliği O6:K2:H1 ve O6:K2 denilen iki farklı tiple izah edilebilir.Tip 1 fimbria bir yana, bu suşlar iki farklı P fimbria üretir.Bunlar, $F7_1$,$F7_2$ ve KS71A, KS71B olarak bilinir.Tip 1C ve KS71C, HA aktivitesine sahip değildir.Dört fimbria da birbirleriyle

benzerdir.Çünkü çok yakın ilişkili kompozisyona sahiptirler ve neredeyse N-terminal aminoasit sıraları eşittir (5 ve or.ref.).

2.8.2.1. Pap Fimbria

1981'de Hull ve ark.(5 ve or.ref.) *E.coli* O4:K6 suşundan Pap fimbria kodlayan bir kromozomal fragment izole etmişlerdir.8.5 kbp'luk bölge, Pap fimbria oluşumu için gerekli olmuştur.Ayrıca, bu bölge fimbria oluşumunda ve HA'da 8 yapısal gen içermektedir (*pap*A-H).Genler, aynı transkripsiyonal oryantasyona sahiptir ve *pap*B'nin proksimaline yerleşik bir destekleyiciden (promoter) kopyası çıkarılmaktadır.Pap fimbrial altbirimlerin yapısal genlerinden daha yukarıda yerleşmiş bölge Pap fimbrianın ısıya bağlı üretimi ile ilişkili regülatör fonksiyonlarını içermektedir.Bu düzenleme transkripsiyonal seviyede yapılmaktadır.P fimbria (*pap*) üroepitelyal hücrelerde bulunan P kan grubu antijenlerine, *E.coli*'nin gal-gal-spesifik bağlanmasını sağlar.*prs* (F) adhesin, yalnızca *pap*G ve *prs*G genleriyle kodlanan terminal reseptör bağlanma bölgesi antijenik olarak *pap* adhesinden ayrılır.F adhesini olarak bilinen reseptörler, globosid ve koyun RBC'lerinin Forssman antijenini içerir (46). *pap*G ve *prs*G arasındaki yüksek derecedeki homoloji yüzünden, Stapleton ve ark.(47) çalışmalarında, adhesiv özellikleri incelemek için P fimbrial (*pap*) probları kullanmışlardır.

2.8.2.2. $F7_2$ Fimbrial Genetik

Van Die ve ark. 1984'te(5 ve or.ref.) $F7_2$ fimbrialar için genetik bir determinant üretmişlerdir.Klonlanan altı yapısal gen, DNA'da yerleşiktir.Bu genlerden beşi fimbria üretimi ve HA için gereklidir.

2.8.2.3. IA2 Fimbrial Genetik

Clegg (5 ve or.ref.) 1982'de üropatojen bir suş olan serotip O6'yı (IA2 suşu) kullanarak MRHA'daki bir fimbrianın sentezini kodlayan bir kromozomal DNA bölgesi izole etmiştir.Bu fimbria, Graaf ve ark.(5 ve or.ref.) tarafından IA2 olarak isimlendirilmiştir.IA2 fimbria ekspresyonu ve HA aktivitesi gösteren en küçük rekombinant plazmid, yaklaşık 6 kbp'lik (kilobase pair) bir kromozomal DNA fragmentidir ve en az 4 polipeptidi kodladığı bulunmuştur.IA2 fimbrial altbirimin, Pap ve $F7_2$ fimbrial altbirimlerle ilişkili genlerden tamamiyle farklı bir pozisyonda yerleştikleri düşünülmektedir.

2.9. Fimbrial Biyogenez

2.9.1. Pap Polipeptitlerinin Fonksiyonları

Pap fimbria ve P adhezyonunun biyogenezindeki genlerin genetik organizasyonu ve fonksiyonu Normark ve onun çalışma grubu tarafından çalışılmıştır (5 ve or.ref.).

Pap fimbriayı kodlayan gen topluluğu, fimbrial altbirimleri veya yakın benzerliği olan polipeptitleri (*pap*H, *pap*E, *pap*F) kodlayan diğer 3 geni içerir.Biyokimyasal ve serolojik bilgiler, *pap*E ve *pap*F gen ürünlerinin Pap fimbrianın minör komponentleri olduğunun göstermektedir.*pap*A'daki mutasyonlar, fimbria oluşumunu bozar fakat, P-spesifik HA'nu etkilemez.*pap*F'deki veya *pap*G'deki mutasyonlar, P-spesifik HA'nu bozar fakat, fimbria oluşumu etkilenmez.Bu sonuçlar *pap*F ve *pap*G ürünlerinin direkt veya dolaylı olarak P reseptörünü bağlamada görev aldığını göstermektedir.*pap*F ürünlerinin P reseptörünün bağlanma domainini bulundurduğu, *pap*G ürünlerinin ise P adhesininin transportu veya modifikasyonunda görev yaptığı öne sürülmüştür(5 ve or.ref.).

*pap*E'deki bir mutasyon P-spesifik HA'nu etkilememektedir.*pap*E gen ürünü Pap fimbrianın minör komponentidir.Böylece *pap*E ürünü adhesinle fimbria arasındaki bağlantı için gerekli olmaktadır.

*pap*C ve *pap*D gen ürünleri hem fimbria oluşumu hem de P-spesifik HA'da gereklidir.Bu iki polipeptid transportta, fimbrial adhesin ve fimbrial altbirimlerin hücre zarı yüzeyine yerleştirilmesinde görev yapmaktadır (5 ve or.ref.).

2.9.2. $F7_2$ Polipeptidlerinin Fonksiyonları

Van Die ve ark.(5 ve or.ref.) $F7_2$ olarak bilinen diğer P fimbriaları kodlayan genlerin organizasyonlarını ve fonksiyonlarını çalışmışlardır.$F7_2$ fimbriaların fenotipik ekspresyonunda ve P-spesifik HA'nunda 5 yapısal gen gösterilmiştir (gen A-E).

2.10. Üreme Ortamlarının Adhesin Üretimine Etkileri

Üreme şartları fimbrial adhesinlerin sentezini etkiler.Örneğin, bütün mannoz rezistant fimbrial adhesinlerin ortak özelliği 18-20°C'de sentezlerinin güçlü bir şekilde baskılanmasıdır (5 ve or.ref.).

Fimbria ekspresyonunu etkileyen diğer önemli bir regülatör olay, faz değişkenliğidir (phase variation).Brinton (5 ve or.ref.) faz değişkenliğini aniden, rastgele, spontan ve geri dönüşümlü olabilen, fimbrialı hücreleri fimbriasız yapabilen veya tersine neden olabilen doğal mutasyonlar olarak değerlendirmiştir.Faz değişikliğinin oranı çevresel şartlardan etkilenir.Bilinen laboratuvar üreme şartları altında, fimbriasız faz hakimdir.Katı besiyerinde üreyen suşlar, tip 1 fimbria üretirler ve iki farklı tipte koloni yaparlar.Sınırlı oksijeni olan ortamda sallanmayan sıvı besiyerindeki üreme, fimbrialı hücrelerin oluşumuna yardım eder.

L-alaninin, K99 fimbriaları üzerine spesifik inhibisyonu vardır.Casamino asitleri bulundurmayan minimal besiyerinde 1mM L-alanin K99 sentezini tamamiyle baskılayabilecek miktardır.Fakat, yüksek konsantrasyonda Casamino asitler, L-alaninin baskılayıcı etkisini ortadan kaldırabilmektedir. TSB'deki düşük glukoz konsantrasyonunda üreme, K99 fimbrialarının üretimini uyarmakta, yüksek

konsantrasyondaki glukoz (%0.15) K99 üretimini baskılamaktadır.Glukozun baskılayıcı etkisi ekstraselüler siklik AMP ilavesiyle ortadan kaldırılabilmektedir.(5 ve or.ref.).

Ticari gamma globulin, sIgA antikoru içeren insan meme sütü ve akut piyelonefritli hastaların idrarındaki IgG ve sIgA fraksiyonları, *E.coli*'nin insan üroepitelyal hücrelerine bağlanmasını durdurur.Bu antikorlar, değişik bakteriyel yüzey yapılarına doğru yönelebilmektedir (48).

2.10.1. Sub-MIC'deki Antibiyotiklerin Adherens Üzerine Etkileri

Düşük konsantrasyondaki antibiyotiklerin bakteriler üzerindeki etkilerini bakteriyal morfoloji, ultrastrüktür, biyokimya ve çoğalma oranlarındaki değişiklikleri gözlenerek değerlendirebiliriz. MAC terimi bakteriyal yapıyı, üreme oranını veya her ikisini birden etkileyebilen antibakteriyel ajanın en düşük konsantrasyonunu gösterir.MAC'ın etkisi, ışık veya elektron mikroskobuyla görülebilen yapısal bir değişiklik oluşturan minimum ilaç konsantrasyonu olan **MAC morfolojisi ve MAC ultrastrüktürü**; diğer yandan, kontrolle karşılaştırılan populasyonda 1 log azalma meydana getiren bir ilacın minimum konsantrasyonunu gösteren, **MAC inhibisyonu** olmak üzere ikiye ayrılır.Sub-MIC'deki antibiyotiklerin birçok hastanın kan ve dokularına hakim olduğu düşünülmektedir.Bu konsantrasyona maruz kalan bakterilerinse anormal morfoloji ve ultrastrüktüre sahip olduğu sanılmaktadır.Antibakteriyal ajanlar, anormal bakteriyal morfoloji oluşturmada çok önemli bir rol oynayabilmektedir.Birçok durumda bu anormal oluşumlar orijinal bakteriye çok az benzemektedir.Antibiyotiklerle bakteriyal yapıda oluşturulan ultrastrüktürel değişiklikler, tamamiyle biyokimyasal değişikliklerin açığa vurulmasıdır.Antibiyotiklerin MIC veya daha yüksek konsantrasyonlarında meydana getirilen değişiklikler sub-MIC'deki antibiyotiklerle üretilenlerinkinden farklıdır.Bununla beraber değişiklikten sorumlu biyokimyasal mekanizmalar da muhtemelen farklı olmaktadır.Böylece, antibiyotiklerin bakterilerdeki etki tarzları ilaç konsantrasyonuyla değişmektedir. Değişik antibiyotiklerin sub-MIC'leri bakteri yüzeyini biraz değiştirmektedir.Böylece bakterinin konak hücre yüzeyine yapışma kabiliyeti değişmektedir.Sub-MIC'deki antibiyotikler antiadhesiv etkilerini üç farklı yolla kullanmaktadır.İlk olarak antibiyotik, yarı oluşmuş adesinin bakteri hücresinden sızmasını sağlar.Bu olayı penisilinle karşılaşmış streptokoklardan lipoteikoik asit kaybında gözleyebiliriz. İkinci olarak, üreyen organizmada yüzey adhesininin oluşumu ve ekspresyonunu baskılar.Antibiyotik son olarak, fonksiyonel olarak amacından uzak bir adhesin oluşumuna neden olmaktadır. Svanborg-Eden bakteriyal adhezyonda antibakteriyal ajanların etki testleri için insan üriner sistem epitelyal hücrelerini içeren bir in vitro sistem ve akut piyelonefritli hastaların idrarından izole edilen *E.coli* kullanmışlardır (49).

Ampisilinin sub-MIC'leriyle karşılaşan *E.coli*, karşılaşmayan bakterilere oranla daha az yapışmıştır (mikroskobik değerlendirme).Kloramfenikol ve nitrofurantoinin subminimal inhibitör miktarları incelenen 15 *E.coli* suşunun yapışmasını etkilememiştir.Klinik olarak elde edilen streptomisine hassas (30 μg/ml MIC) *E.coli* suşunda streptomisinin düşük konsantrasyonları (0.5-10 μg/ml) mannoz bağlama ve epitele yapışma aktivitelerinde çarpıcı bir azalmaya neden olmaktadır.Bunun tersine streptomisinin 5000 μg/ml den yukarı konsantrasyonları , streptomisine dirençli olan (20.000 μg/ml) bir izojenik mutant üzerine etkili olmamaktadır.Sonuçlar, sub-MIC' deki antibiyotiklerin *E.coli*'nin epitel hücrelere yapışmasında gerekli olan ligand oluşumu ve/veya ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir (49).

Streptomisinin etkisi tip 1 fimbria üzerine olmaktadır.Bununla beraber, Streptomisinin etkisinden erken logaritmik üreme fazında söz edilebilir.Eksponansiyel üreme fazında etkisi yoktur. Araştırıcılar, streptomisin etkisinin hatalı okuma (missreading) yüzünden anormal fimbrial proteinlerin üretimi şeklinde olduğunu öne sürmektedirler (5 ve or.ref.).

Streptomisin, kloramfenikol, tetrasiklin, klindamisin veya trimetoprim-sulfametoksazol gibi antibiyotiklerin 1/4 MIC' lerinde üredikten sonra, *E.coli* suşunun insan epitel doku kültür dizilerine (intestine 407) yapışması, azalmaktadır.Nalidiksik asit 1/4 MIC'de bakteriyel yapışmayı arttırmaktadır (49).

Trimetoprim, DNA ve RNA sentezini bozan bakteriyel folat metabolizmasının inhibitörüdür.Bu özelliği, adherens işleminde görev alan pili gibi yapıların hatalı veya eksik üretimine neden olur (48). 1/2-1/8MIC'de trimetoprim, sulfadiazin, sulfametoksazol ve sulfatiazolle karşılaşan *E.coli*'nin eritrositlerle aglütinasyon ve insan yanak hücre epitellerine yapışma kapasiteleri, önemli derecede azalmaktadır.Tetrasiklin fosfat, doksisiklin, oksitetrasiklin, minosiklin, kloramfenikol ve nafsilin ile karşılaşmış *E.coli*'nin hemaglütinasyonu inhibe olmaktadır.Penisilin veya streptomisinin 1/2 MIC'inde üretilen *E.coli*'nin mannoz bağlama yeteneği azalmaktadır.Ofek ve ark.(50 ve oradaki referans) Penisilinin 1/4 MIC'i etkisi altında MS^+ *E.coli* suşunun adherensindeki azalmaya, pili ekspresyonundaki kaybın neden olduğunu önermişlerdir.

Birçok subinhibitör konsantrasyondaki aminoglikozid ve diğer protein sentez inhibitörleri adherensi azaltmaktadır(50). Bu antibiyotikler, fimbria üretimine zarar verir(5). Eisenstein ve ark.(5 ve or.ref.) sublethal konsantrasyonda üreyen *E.coli* 'nin mannan içeren maya hücrelerini aglütine etme ve insan yanak mukoza hücrelerine yapışma yeteneklerini kaybettiğini bulmuşlardır.

Sublethal konsantrasyolardaki Ampisilin ve Amoksisilin in vitro olarak adherensi azaltıcı aktiviteye sahiptir.Bu etkiyi açıklayan altta yatan mekanizmanın, bakteri yüzeyindeki adhezyona aracılık eden yapıylardaki eksiklikler veya uzamış (elongated) formlar oluşturan bakteriyel hücre duvar sentezindeki çarpıklıklar olabileceği

düşünülmektedir.Brinton'a göre(5 ve or.ref.) streptomisin, fimbriasız hücrelerin tip 1 fimbrialarının rejenerasyonunu durdurmakta, kloramfenikol bunu yapmamaktadır.

Mesillinam'ın, adherens üzerine etkili olmadığı açıklanmıştır (50).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Bakteriyal Suşlar

Bu çalışmada İYE şikayetiyle laboratuvarımıza gelen hastaların idrarlarından izole edilen 4 *E.coli* suşu kullanılmıştır.Bu suşlar içinde birbirinden farklı aglütinasyon ve adherens özelliği gösterenler bulunmaktaydı.

3.1.2.Kullanılan Gereçler

Tez çalışması süresince aşağıdaki araç ve gereçlerden yararlanıldı:

1. Otoklav
2. Etüv
3. Manyetik karıştırıcı
4. Benmari
5. Distile su cihazı
6. Hassas terazi
7. Değişik cam malzemeler
8. Hava komprosörü
9. Otomatik pipetler
10. Bakteriyolojik hazır besiyerleri
11. Değişik kimyasal malzemeler
12. Sallayıcı (shaker)
13. Vortex
14. Milipor membran filtresi
15. Binoküler araştırma mikroskobu
16. Buzdolabı
17. Derin dondurucu (-20°C ve -70°C)

3.1.3. Fimbriasyon İçin Kullanılan Besiyeri

Fimbriasyon için CFA agar kullanıldı.Terkibi aşağıdaki gibidir:

%1 Casamino acids (DIFCO 0230-01-1, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), %0.15 Yeast extract (DIFCO 0127-01-7,Detroit,Michigan,USA), %0.005 $MgSO_4$ (Riedel-de Haen 31420), %0.0005 $MnCl_2$ (MERCK,Darmstadt,Germany), %2 Agar (OXOID L11, Basingstoke, Hampshire, England) ve pH 7.4 olacak şekilde hazırlandı.

3.1.4. Deneylerde Kullanılan Tampon Solüsyon

Maya, eritrosit ve epitel hücre solüsyonlarını hazırlamak,lam HA ve HA titrelerinin bulunması, aderens aktivitelerinin belirlenmesi için ticari olarak hazır PBS (=Phosphate Buffered Saline [OXOID BR14a, England]) tabletleriyle hazırlanan tampon solüsyon kullanıldı. 100 ml distile suda 1 tablet çözüldü ve 1 atm. basınç altında 121°C de otoklavlandıktan sonra kullanıldı.

3.1.5. Deneylerde Kullanılan Maya Hücreleri

Maya aglütinasyonunda *Candida* sp. hücreleri kullanıldı.Maya üretimi için yatık Saboraud Dextrose Agar (BIOLIFE 2005, Milano, Italy) kullanıldı.

3.1.6. Eritrosit Süspansiyonu

%2' lik ES süspansiyonu hazırlamak için, K.T.Ü. Farabi Hastanesi Kan Bankası'ndan temin edilen 0 Rh^+ kan grubuna sahip kişilerden hazırlanmış eritrosit süspansiyonu kullanıldı.

3.1.7. Antibiyotikler ve Stok Solüsyonları

a) Meropenem ve stok solüsyonu:

Meropenem (ZENECA Inc. 89677-02, Wilmington, USA), ZENECA Pharmaceuticals Group tarafından laboratuvarımıza hediye edilmiştir.

MIC belirlenmeleri için gereken antimikrobiyal stok solüsyonun hazırlanışı firmanın kitapçığında önerildiği gibi 0,128 mg/ml olarak hazırlandı.Deneyde kullanılacak miktarı alınıp 1'er ml'lik kısımlara ayrılarak testler yapılana kadar -70°C'de saklandı.

b) Gentamisin ve stok solüsyonu:

Gentamisin (SIGMA G1272,St.Lois,USA) solüsyonundan 1 mg/ml stok solüsyon hazırlandı ve 1'er ml'lik kısımlara ayrılıp testler yapylana kadar -20°C'de saklandı.

c) Tetrasiklin ve stok solüsyon:

Tetracycline Hydrochloride Crystalline (SIGMA T 3383,St.Lois, USA) den 2 mg/ml stok solüsyon hazyrlandy.1 er ml' lik kısımlara ayrılarak testler yapılana kadar -20°C'de saklandı.

3.1.8.Epitel Hücreler

Çalışmada, adherens testleri için sağlıklı kişilerin yanak mukoza hücreleri (buccal cells) kullanıldı.

3.2. METOD

3.2.1. Bakteriyal Suşların İzolasyonu ve Saklanması

Hastalardan temin edilen orta akım idrar örnekleri mikroskobik olarak bakteriürisi ($\geq 10^5$ bakteri/ml) olduğu saptananlar; halka çapı 4 mm , 0.01 mm^3 hacminde sıvı alabilen kalibreli bir öze ile %5-7 koyun kanı katkılı MHA(=Mueller Hinton Agar [OXOID CM337,Basingstoke,Hampshire,England]) ve Eosin Methylene Blue Agar With Lactose And Sucrose (BIOLIFE 14501,Milano,Italy) besiyerlerinin her ikisine birden ekimleri yapıldı.35-37°C'de 18 saat inkübe edildi.Üreyen bakteri kolonilerinin

morfolojik özellikleri (S-tipinde,pembe-siyah ve metalik röfle veren koloniler) ve biyokimyasal özelliklerine (İndol, Metil red, Voges-Proskaur, Sitrat) bakılarak *E.coli* olduğu saptanan bakteriler testler yapılana kadar yağsız steril süt içinde -70°C'de saklandılar.Serotip tayini yapılmadı.

3.2.2. Bakterilerin Fimbriasyonu

Öncelikle -70°C'de saklanan bakterilerin canlanması için %5-7 koyun kanı katkılı MHA yüzeyine ekimleri yapıldı.35-37°C'de 18 saat inkübe edildi.Üreyen bakteri kolonilerinden tek koloni alarak yeterli fimbrial ekspresyonunun sağlanması için birçok çalışmada önerilen CFA agar yüzeyine 3 kere pasajları yapıldı. 37°C'de 18 saat inkübe edildi ve testlerde kullanıldı (16,20,21,28).

3.2.3. Bakteri Solüsyonlarının Hazırlanması

a) Mikrotitre HA deneyleri için bakteri solüsyonu:

Korhonen ve ark.(21) önerilerine göre ve küçük modifikasyonlarla CFA agarda 3 kere pasaj edilmiş bakterilerden 10^{10} CFU/ml olacak şekilde hazırlandı,

b) Adherens testleri için bakteri solüsyonu:

CFA Agar'da 3 kere pasaj edilmiş bakterilerin birçok yazarın önerisi doğrultusunda ve bazı küçük modifikasyonlarla solüsyonları hazırlandı (28,29).Üreyen bakteri kolonilerinden bir tanesi özeyle alınarak 5 ml TSB içine ekim yapıldı ve 3 saat 37°C 'de inkübe edildi.3 saat sonra 0.5 Mc Farland bulanıklığına sahip solüsyon elde edildi ($1.5x10^8$ CFU/ml).Bu solüsyondan 666 µl alıp 1 ml'ye tamamlandığında solüsyonda 10^8 CFU/ml hücre olduğu varsayılarak 3 kere PBS ile yıkandı ve deneylerde kullanıldı.

3.2.4. Maya Solüsyonunun Hazırlanması

Agar yüzeyinden bütün koloniler steril pamuklu bir eküvyonla toplanarak PBS içinde solüsyonu yapıldı.3 kere PBS ile 3000 rpm'de 20 dk. santrifüj edilerek yıkandı.Maya aglütinasyonunda kullanılmak için birçok yazarın önerdiği gibi PBS içinde 6 Mc Farland bulanıklığını sağlayacak şekilde süspansiyon yapıldı (18).

3.2.5. Maya Aglütinasyonunun Yapılması

Maya aglütinasyonu bazı çalışmaların önerileri doğrultusunda yapıldı (17,18).Mikroskop lamı üzerine, bir damla maya solüsyonundan, üzerine aynı hacimde bakteri solüsyonundan damlatıldı. 3-5 dk. dairesel halkalarla oda sıcaklığında makroskobik aglütinasyon gözlendi.

3.2.6. MIC Belirlenmesi

MIC belirlenmeleri, tüp dilüsyon metoduyla , bakteriler 3 kere CFA agara pasaj edildikten sonra yapıldı.Çünkü sub-MIC'lerdeki HA deneyleri MIC belirlenmesinden sonra yapılacaktı.

TSB (=Tryptone Soya Broth [OXOID CM129, Basingstoke, Hampshire, England]) da antibiyotiklerin seri halindeki ikişer kat solüsyonlaryna $2x10^7$ log-fazındaki bakteriler ilave edildi.Gözle görülebilir üremenin inhibe edildiği antibiyotik dilüsyonu MIC olarak kaydedildi.Sonraki dilüsyonlar sub-MIC olarak belirlendi (1/2 MIC ile 1/16 MIC arası tüm konsantrasyonlar).

3.2.7. %2'lik ES'nun Hazırlanması

HA deneyleri için 5-10 ml eritrosit süspansiyonu ölçekli bir santrifüj tüpü içinde PBS ile 3000 rpm'de 15-20 dk. 3 kere yıkandı.Elde edilen eritrosit paketinden PBS kullanılarak %5'lik stok ES hazırlandı (5 ml ye 95 ml olacak şekilde).Daha sonra %5'lik ES'ndan HA deneylerinde kullanılacak olan %2'lik ES hazırlandı.İki tane hazırlanan ES'larından birine %2 olacak şekilde D-mannoz eklendi.

3.2.8. HA Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.8.1. Lam Üzerinde HA Aktivitelerinin Belirlenmesi

HA aktiviteleri, Korhonen ve ark.(43 ve oradaki referanslar) tariflerine göre lam aglütinasyonuyla yapıldı.İki mikroskop lamına birer damla PBS damlatıldı ve CFA agardan bir öze dolusu bakterinin PBS içinde yoğun bir süspansiyonu hazırlandı.Üzerine bir damla D-mannoz içermeyen eritrosit süspansiyonundan,diğer lam üzerine %3 D-mannoz içeren eritrosit süspansiyonundan bir damla damlatıldı.Buz üzerinde 4-5 dk. dikkatli bir şekilde dairesel hareketlerle karıştırıldı.

HA reaksiyonları +4 (maksimum,tüm eritrositler aglütine edilmiş), +3 (güçlü), +2 (orta), +1 (zayıf ,yavaş HA) veya negatif olarak değerlendirildi.HA'ların buz üzerinde yapılmasının sebebi önceden açıklanmıştır (2.5.1.).

Sub-MIC dilüsyonlarını (1/2-1/16MIC) içeren tüplerdeki tüm bakteriler 3000 rpm'de 20 dk. santrifüjlenerek PBS ile 3 kere yıkandı.Yıkanan bakteriler, resüspanse edildi ve HA aktiviteleri için önceden tarif edildiği şekilde PBS içinde solüsyonları hazırlandı.Her bakterinin 1/2 MIC ile 1/16 MIC arası konsantrasyonlarındaki HA aktiviteleri buz üzerinde lam aglütinasyonuyla belirlendi.

Antibiyotikle karşılaşmamış bakterilerin önceden yapılmış HA'larıyla sonradan sub-MIC konsantrasyonlarla karşılaşmış bakterilerin HA'ları arasındaki farklar, HA'daki artış veya azalışa göre kaydedildi.

3.2.8.2. Mikrotitre HA Deneylerinin Yapılması

HA titreleri 96 kuyucuklu U-dipli plateler kullanılarak yapıldı.Antibiyotiklerle karşılaşmamış ve başlangıç konsantrasyonu 10^{10} CFU/ml olacak şekilde seri olarak hazırlanmış 25 µl bakteri dilüsyonlarına aynı hacimde %2'lik ES'nundan eklendi.Plate 4°C'de 4 saat inkübe edildi.Tam HA gözlenen en yüksek bakteriyal dilüsyon, o bakteri suşu için HA titresi olarak alındı.Dört bakteri suşu da aynı yöntemle test edildi.

Sub-MIC'lerin HA titrelerine olan etkileri de aynı yöntemle yapıldı.Fakat her bakteri suşu bir antibiyotiğin 1/4 ile 1/16MIC'i ile ayrı ayrı bir gece karşılaştıktan sonra test edildi.Bütün bakteri suşları 3 antibiyotiğin sub-MIC'lerine ayrı ayrı maruz bırakılarak test edildi.

3.2.9. Epitel Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması

Hücreleri alınacak kişinin ağzı temizletildikten sonra,steril abestanlarla yanak mukozasına sürtülerek alınan hücreler 4°C PBS içinde süspanse edildi.Testler yapılmadan önce 250 g'de 10 dk. üç kere PBS ile yıkandı.Adherens testleri için Eden ve ark.(39) nın ve Kallenius ve ark.(27) nın önerilerine küçük modifikasyonlar eklenerek 10^5 hücre/ml solüsyon hazırlandı.Mililitredeki hücre sayısı Bürckner chamber (Thoma lamı) kullanılarak ayarlandı.Hazırlanan hücre solüsyonu üç saat içinde kullanıldı.

3.2.10. Sub-MIC'lerdeki Adherens Aktivitelerinin Belirlenmesi

Bazı araştırıcıların yöntemleri ve küçük modifikasyonlarla adhezyon testleri yapıldı (41,50,51).

Her bakteri suşu için antibiyotiklerin önceden belirlenen sub-MIC konsantrasyonlarını içeren 1 ml TSB besiyerinde, CFA agarda 3 kere pasaj edilerek fimbriasyonu sağlanmış bir bakteri kolonisinin bir kısmı öze ile alınarak ekim yapıldı.37°C de 4 saat inkübe edildi.3000 rpm'de 20 dk. santrifüjlenerek bakteri pelleti elde edildi.PBS ile 3 kere yıkandıktan sonra 0.5 Mc Farland bulanıklığını sağlayacak şekilde PBS içinde süspansiyon yapıldı. Bu süspansiyondan 10^8 CFU/ml olacak şekilde 1 ml hazırlandı ve aynı hacimde 10^5 epitel hücre ile karıştırılıp 37°C'ye ayarlı bir sallayıcıda (shaker) 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra epitel hücreleri tutup, yapışmamış bakterileri yıkamak için 5.0 µm Membrane Filters (WHATMAN 7195 004, Maidstone,England) kullanıldı.Temizlenememiş bakterileri de yıkamak için 10-15 ml daha steril PBS geçirildi.Filtre kağıdı temiz bir lam üzerine ters olarak yerleştirildi ve hücreler metanolle tespit edildikten sonra 1 dk. metilen mavisiyle boyandı.Işık mikroskobunda (x1000) 40 tane epitel hücreye yapışmış bakteri sayısı belirlendi. Tüm *E.coli* suşlarının 3 antibiyotiğin 1/4-1/16MIC'leri arasındaki konsantrasyonlarındaki yapışma sayıları aynı şekilde belirlendi.

3.2.11. İstatistiksel Metod

Adheres deneylerindeki sonuçların anlamlılığını belirlemek için istatistiksel metod olarak Student *t* testi kullanılmıştır ve antibiyotiklerin 1/4 ile 1/8MIC'leriyle karşılaşmış tüm suşların adherensindeki azalmaları kontrol adherenslerle karşılaştırılmıştır. $P<0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MIC'ler

E. coli-9, *E. coli-11*, *E. coli-29* ve *E. coli-36* ya karşı antibiyotiklerin MIC'leri (μg/ml) sırasıyla aşağıdaki gibidir: meropenem, 0.5, 1, 1, 1; gentamisin, 62.5, 31.2, 62.5, 62.5; tetrasiklin, 250, 250, 250, 250.

4.2. Lam HA ve Mikrotitre HA Deneyleri

Lam üzerinde HA'ları yapılan 4 suşun MR^+ adhesinlere sahip olduğu belirlendi. Bu adhesinler paralelinde 4 suşta MRHA gözlendi.İki suşta (*E. coli-9* ve *E. coli-29*) güçlü HA, iki suşta (*E. coli-11* ve *E.coli-36*) maksimum HA derecesi gözlendi (Tablo 3).

Tablo 3'de gösterilen MS^+ adhesinler maya aglütinasyonu ile, MR^+ adhesinler ise MRHA ile tespit edildi. Maya aglütinasyonu, ortama %3 D-mannoz ilavesiyle inhibe edildi.

Tablo.3. Suşların adhesin ve HA aktiviteleri.

Üropatojen suşlar	Adhesin	HA aktivitesi
E.coli-9	MS^+ , MR^+	MRHA
E.coli-11	MS^+ , MR^+	MRHA
E.coli-29	MS^+ , MR^+	MRHA
E.coli-36	MS^+ , MR^+	MRHA

Tablo.4. Meropenemin 1/4-1/16 MIC'lerinde suşların lam HA dereceleri.

Suşlar	1/4 MIC HA	1/8 MIC HA	1/16 MIC HA	HA derecesi
E.coli-9	-	+	++	+++
E.coli-11	-	-	+	++++
E.coli-29	-	+	++	+++
E.coli-36	-	+	++	++++

+: Zayıf HA ++: Orta HA +++: Güçlü HA ++++: Maksimum HA

Tablo.5. Gentamisinin 1/4-1/16 MIC'lerinde suşların lam HA dereceleri.

Suşlar	1/4 MIC HA	1/8 MIC HA	1/16 MIC HA	HA derecesi
E.coli-9	-	++	+++	+++
E.coli-11	-	++	+++	++++
E.coli-29	-	++	+++	+++
E.coli-36	-	++	+++	++++

+: Zayıf HA ++: Orta HA +++: Güçlü HA ++++: Maksimum HA

Tablo.6. Tetrasiklinin 1/4-1/16 MIC'lerinde suşların lam HA dereceleri.

Suşlar	1/4 MIC HA	1/8 MIC HA	1/16 MIC HA	HA derecesi
E.coli-9	-	+	++	+++
E.coli-11	-	++	+++	++++
E.coli-29	-	+	++	+++
E.coli-36	-	++	+++	++++

+: Zayıf HA ++: Orta HA +++: Güçlü HA ++++: Maksimum HA

Dört *E. coli* suşunun (*E. coli-9, E. coli-11, E. coli-29, E. coli-36*) HA titreleri ilaçsız ortamda yapılıp bulunan titreler, kontrol olarak alınıp bu kontrollere göre bütün ilaçların HA titrelerine olan etkileri tablolarda gösterilmiştir (Tablo7-9).

Tablo 7. Meropenemin 1/4-1/16MIC'lerinde suşların HA titreleri.

Suşlar	Kontrol HA Titresi	1/4 MIC HA Titresi	1/8 MIC HA Titresi	1/16 MIC HA Titresi
E. coli-9	1:128	1:4	1:8	1:16
E. coli-11	1:512	1:16	1:64	1:256
E. coli-29	1:128	1:4	1:32	1:64
E. coli-36	1:256	1:4	1:8	1:16

Tablo 8. Gentamisinin 1/4-1/16MIC'lerinde suşların HA titreleri

Suşlar	Kontrol HA Titresi	1/4 MIC HA Titresi	1/8 MIC HA Titresi	1/16 MIC HA Titresi
E. coli-9	1:128	1:32	1:64	1:128
E. coli-11	1:512	1:128	1:256	1:512
E. coli-29	1:128	1:32	1:64	1:128
E.coli-36	1:256	1:32	1:64	1:128

Tablo 9. Tetrasiklinin 1/4-1/16MIC'lerinde suşların HA titreleri

Suşlar	Kontrol HA Titresi	1/4 MIC HA Titresi	1/8 MIC HA Titresi	1/16 MIC HA Titresi
E. coli-9	1:128	1:32	1:64	1:128
E. coli-11	1:512	1:64	1:128	1:256
E. coli-29	1:128	1:16	1:32	1:128
E. coli-36	1:256	1:16	1:32	1:128

Lam HA'nunda antibiyotiklerin 1/4 MIC'lerinde bütün suşlarda HA'nun tamamiyle baskılandığı görüldü (Tablo 4-6).

Meropenemin 1/4 MIC'inde tüm suşların HA titrelerinde 6-7 kat, gentamisinde 3-4 kat, tetrasiklinde 4-5 kat artış oldu. (Tablo 7-9).

Yalnızca meropenemin 1/8 MIC'inde bir suşun (*E.coli-11*) lam HA derecesi +4 dereceden (kontrol HA derecesi) sıfıra düşürdü, HA titresini 1:512 den (kontrol HA titresi) 1:64 e yükseltti ve bu konsantrasyonda diğer iki ajan böylesine bir etki göstermedi (Tablo 4-7).Diğer suşlarda meropenemin bu konsantrasyonunda lam HA derecelerinde 2-3 derece azalma, HA titrelerinde 3-6 kat artış gözlendi.Gentamisin bu konsantrasyonda suşların lam HA derecelerini 1-2 derece azaltırken, HA titrelerini 1-2 kat artırdı, tetrasiklin aynı konsantrasyonda suşların HA derecelerini 2 derece azaltırken, HA titrelerini 1-3 kat artırdı (Tablo 4.-9.)

Meropenemin 1/16 MIC'inde tüm suşların HA derecelerinde 2 derece azalma, HA titrelerinde 1-4 kat artma görülürken; gentamisin HA derecesinde 0-1 derece azalmaya, HA titresinde 1-2 kat artışa; tetrasiklin HA derecesinde 1 derece, HA titresinde 1 kat artışa neden oldu (Tablo 4-9).

4.3. Sub-MIC'lerin in vitro Adherense Etkileri

Bütün bakteri suşlarının antibiyotiklerle karşılaşmadan önce yüksek düzeyde adherens özelliğine sahip olduğu görüldü. Kontrol olarak Tablo 10'da gösterilen değerler antibiyotiklerin 1/16 MIC'leri ile karşılaımış bakterilerin adherensleridir.

Tablo 10. Antibiyotikle karşılaşmış *E. coli* izolatlarının insan yanak mukoza hücrelerine in vitro adherens oranları.

E.coli suşu	İlaç konsant.	Meropenem	Gentamisin	Tetrasiklin
E.coli-9	**Kontrol**	**127±1.95**	**153±1.13**	**135±1.00**
	1/8 MIC	108±0.99	129±1.14*	116±1.42
	1/4 MIC	87±1.13*	82±1.55**	58±0.71**
E.coli-11	**Kontrol**	**160±1.63**	**171±1.28**	**165±0.99**
	1/8 MIC	125±1.20*	120±0.87**	134±0.83*
	1/4 MIC	91±1.54**	109±1.96**	110±1.00**
E.coli-29	**Kontrol**	**135±1.37**	**171±1.10**	**173±1.78**
	1/8 MIC	115±1.24*	138±1.51*	154±1.46
	1/4 MIC	86±1.27**	119±1.54**	118±1.19**
E.coli-36	**Kontrol**	**146±0.98**	**156±0.81**	**158±0.98**
	1/8 MIC	92±0.79**	128±0.87*	131±0.55*
	1/4 MIC	60±0.75**	108±1.39**	110±1.20**

* P< 0.05 olarak anlamlı bulunan değerler.

** P< 0.001 olarak anlamlı bulunan değerler.

Gentamisin ve tetrasiklinin 1/4 MIC'lerinde kontrollere göre, bütün suşlardaki adherenste istatistiki olarak yüksek düzeyde azalma gözlendi (P<0.001).Ancak meropenemin aynı konsantrasyonunda 1 suşun (*E.coli-9*) adherensindeki azalması istatistiki olarak diğer antibiyotikler kadar anlamlı düzeyde bulunamadı (P<0.05) (Tablo 10).

Tetrasiklininin 1/4 MIC'inde bütün suşların adherensini azaltmadaki etkisi yüksek oranda anlamlı sonuçlara sahip fakat, aynı konsantrasyonda meropenem, sadece 3 suşun (*E.coli-11, E.coli-29 ve E.coli-36*) adherensini azaltmada yüksek düzeyde anlamlı sonuçlara sahip oldu. Bu konsantrasyonda gentamisin bütün suşlarda, tetrasiklinle aynı oranda anlamlı sonuçlar verdi ($P<0.001$) (Tablo 10).

1/8 MIC'de meropenem 1 suşun (*E.coli-9*), tetrasiklin 2 suşun (*E.coli-9* ve *E.coli-29*) adherensini anlamlı düzeyde azaltamadı ($P>0.05$).Aynı konsantrasyonda gentamisin 1 suşta (*E.coli-11*) $P<0.001$, diğer 3 suşta $P<0.05$ olarak anlamlılıkla azalmaya neden oldu. Bu konsantrasyonda meropenem 1 suşun adherensini yüksek oranda anlamlı olarak azaltmasına rağmen ($P<0.001$), tetrasiklin aynı konsantrasyonda bütün suşların adherensini meropeneme göre daha az anlamlılıkla azalttı ($P<0.05$)(Tablo 10).

5. TARTIŞMA

Birçok araştırıcı bazı antibiyotiklerin sub-MIC'lerinin UPEC'nin üroepitelyal hücrelere, yanak mukoza epitellerine, kültür edilmiş insan intestinal hücrelere ve insan eritrositlerine in vitro olarak yapışmasını azaltabildiğini rapor etmişlerdir (48,50,51,52).İlk olarak Svanborg-Eden antibiyotiklerin antiadhezyon etkilerini göstermiştir.

HA tekniklerinin bakteriyel yapışmanın değerlendirilmesi için uygun bir yöntem olduğu önerilmiştir.Bakteriyal pililerin bakteriyal yapışmaya olduğu kadar HA'na da aracılık ettiği düşünülmüştür (53).

Yapılan bir çalışmada, antibiyotiklerle farklı şekillerde etkilenebilen HA ve adherensin, birbirinden bağımsız özellikler olduğu rapor edilmiştir.Yapılan çalışmada kullanılan 4 *E.coli* suşundan ikisinin doku kültür hücrelerine yapışmamış fakat, HA özelliği gösterdiği bulunmuştur.(48).Bu çalışmada da bütün suşların lam HA'nu antibiyotiklerin 1/4 MIC'leri tarafından tamamiyle durdurulmasına rağmen bu konsantrasyonda suşlar doza bağlı olarak epitel hücrelere belirli miktarlarda yapıştı (Tablo 4-9).Fakat, mikrotitre HA deneylerinde bu konsantrasyonda çok yüksek titrede bile olsa suşların HA gösterdiği bulundu (Tablo 7-9).Aynı şekilde meropenem 1/8 MIC'de 1 suşun (*E.coli-11*) lam HA aktivitesini tamamiyle durdurdu fakat, HA titrelerinde kontrollerine göre çok fazla arttığı gözlendi. (Tablo 7-9). Bunun nedeninin, lam HA deneyinin değerlendirmesinin (0 ile +4) subjektif olmasından kaynaklandığını düşünülmektedir. Sonuçlar lam HA'nunun mikrotitre HA deneyine göre daha az hassas bir yöntem olduğunu düşündürmektedir.Buna rağmen, lam HA sonuçlarıyla mikrotitre HA sonuçları arasında HA'nu azaltma açısından benzer bir paralellik olduğu tablolarda görülmektedir (Tablo 4-9).Bu paralellik lam HA'nun daha basit ve daha az zaman isteyen bir yöntem olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmadaki bütün suşların MRHA yapmaları büyük olasılıkla P-fimbriaya (MR^+ adhesin) sahip olduklarını göstermektedir (Tablo 3). Kontrol HA titrelerindeki farklılığın sebebinin, bakteri suşlarının farklı oranda P-fimbria ekspresyonunundan kaynaklananabileceği ihtimali yüksektir.

Mikrotitre HA deneylerinde antibiyotiklerin sub-MIC'leriyle karşılaşmış bakteriler ancak yüksek titrede HA aktivitesine sahip olabiliyorsa, antibiyotiğin kullanılan sub-MIC'inin bakterinin HA'nunu azalttığı sonucuna varıldı.HA için en düşük sub-MIC'de en yüksek bakteri titresi gerektiren antibiyotik HA'nu azaltma açısından en etkili antibiyotik olarak değerlendirildi.Böylece, bir antibiyotiğin sub-

MIC'inin HA aktivitesini azaltma kapasitesi, o suşun HA yapabilecek titresiyle doğru orantılı olduğu önerildi.

Gentamisin ve tetrasiklinin 1/4 MIC'lerinde birçok çalışmada (48,49) olduğu gibi bu çalışmada da 4 suşun lam HA derecelerinde azalma ve HA titrelerinde artış oldu. (Tablo 5.6.8. ve 9.) .Bu sebepten, suşların HA derecelerine ve HA titrelerine meropenemin etkileri, diğer iki ilacın etkileriyle karşılaştırıldı.

Lam HA'larına ve HA titrelerine bakarak HA'nu baskılama açısından en etkin ajanların sırasıyla meropenem, tetrasiklin ve gentamisin olduğu görüldü (Tablo 4-9).

Genelde birçok bakteri infeksiyonu patojenik mikroorganizmaların konak epitelyal yüzeylerine yapışmasıyla başlatılır.Yapışma yeteneği bakteriye vücut sıvıları tarafından yıkanmaya dirençlilik gibi birçok avantaj sağlar.Bakterinin epitelyal hücrelere in vitro adherens kapasitesi direkt olarak İYE'nun şiddetiyle ilişkili olduğu sanılmaktadır ve sistitten izole adilenlerden daha etkili yapıştığı rapor edilmiştir (52).

Piyelonefritojenik *E.coli* 'nin aderensi üriner sistemde bulunan dokulardaki karbohidrat rezidülerini tanıyabilen P fimbrialarla olduğu rapor edilmektedir. Böylece ligand-reseptör etkileşiminin bozulması İYE'larının profilaksisi ve terapisinde faydalı olabileceği savunulmaktadır (51,52). Antibiyotiklerin sub-MIC'lerinin araştırılmasında etkileri en fazla karşılaştırılan antibiyotik bu etkileri iyi bilinen trimetropimdir (44,46,47). Bu çalışmada trimetropimin kullanılmamasının nedeni, klinik izolatların bu antibiyotiğe yüksek düzeyde direnç göstermesiydi (>20.000 μg/ml).Bu konsantrasyonda bakteriyal izolatların mikroskobik incelemelerinde filamentöz morfoloji oluşturdukları görüldü. Birçok araştırıcı filamentöz morfoloji oluşturan bakterilerin epitel hücrelere adherensini kaybettiğini önermektedir (46,47).

Kovarik ve ark. (47) yaptıkları bir çalışmada siprofloksasin, fleroksasin, norfloksasin ve nalidiksik asit olmak üzere çalışmanın yapıldığı dönemde İYE'larında yeni kullanıma girmiş olan 4 kinolon grubu antibiyotiğin, adherens üzerine etkilerini T24 hücre dizisi (human uroma cell line) kullanarak trimetropimin etkileriyle karşılaştırarak araştırmışlardır.Sonuçta kullanılan 4 antibiyotiğin 1/4-1/8 MIC'lerinde trimetropime nazaran istatistiki olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir. Bu çalışmada; kullanıma yeni girmekte olan ve bir karbepenem antibiyotik olan meropenemin adherens üzerine olan etkileri, gentamisin ve tetrasiklin olmak üzere bu etkileri 1/4 MIC'lerde bilinen iki antibiyotikle karşılaştırıldı.Yukarıdaki çalışmayla aynı istatistiksel metod kullanılan bu çalışmada elde edilen sonuçların ışığında meropenemin anlamlı düzeyde adherens üzerine etkili olduğu düşünüldü. Bu çalışmada bu etkisinin mekanizmasından ziyade, sadece adherensi azaltmadaki etkinliğinin istatistiki olarak üzerinde duruldu.

Bu çalışmada kullanılan klinik orijinli *E. coli* suşlarının HA ve insan yanak mukoza epitellerine adherens aktivitelerine, 3 antibiyotiğin sub-MIC'leri doza bağlı olarak azaltıcı etkiler gösterdi.

Kullanılan 3 antibiyotiğin 1/4-1/8 MIC'lerinde adherenslerindeki azalmalara bakılacak olursa, istatistiki olarak en etkili antibiyotiklerin sırasıyla gentamisin, meropenem ve tetrasiklin olduğu görülmektedir (Tablo 10). Çünkü bütün suşlarda adherensi azaltma açısından en fazla anlamlı sonuçlar gentamisinin ve tetrasiklinin 1/4 MIC'inde elde edilmiştir ($P<0.001$).Bu orandaki anlamlılık meropenemde 1 suş (*E.coli-9*) hariç diğer 3 suşta elde edildi.Fakat tetrasiklin ve meropenem karşılaştırıldığında, 1/8 MIC'de 2 suşun (*E.coli-9 ve E.coli-29*) adherensindeki azalma anlamsızken, aynı konsantrasyonda meropenem 1 suşun (*E.coli-9*) adherensinde anlamsız oranda azalmaya neden oldu ($P>0.05$).Buna rağmen, tetrasiklin 1/4 MIC'de adherensi meropenemden daha anlamlı oranlarda azalttı fakat, meropenemin daha düşük konsantrasyonunda (1/8 MIC) tetrasiklinden daha anlamlı azalışlara neden olması meropenemin tetrasiklinden daha etkili olarak adherensi azalttığını düşündürmektedir (Tablo 10).

Vosbeck ve ark. (48), 1/4 MIC'de tetrasiklin ve klindamisin kullanarak yaptıkları adhezyon ve HA deneylerinde kullanılan 9 *E.coli* suşundan 4 suşun (%45) insan eritrositlerini aglütine ettiğini, 1 suşun adhezyon ve HA'u azaltma açısından ne tetrasiklinden ne de klindamisinden etkilendiğini rapor etmişlerdir.Aynı çalışmada HA ve pili oluşturma kapasitesinin antibiyotiklerden farklı şekilde etkilenen, birbirinden bağımsız özellikler olduğu vurgulanmaktadır.Çalışmamızda 4 suşun hepsinin (%100) insan eritrositlerini aglütine ettiği ve kullanılan ilaçların hepsinin hem 1/4 MIC'inden hem de 1/8 MIC'inden doza bağlı olarak belirli oranlarda etkilendiğini gözledik.Fakat, antibiyotiklerin 1/4 MIC'lerinde suşların lam HA'ları tamamiyle durdurulmuş, HA titreleri yüksek düzeyde artmış olmasına rağmen, suşlarda doza bağlı olarak azalan adhezyon gözlendi.Böylece,suşların HA'nu ile adhezyonlarındaki baskılanma arasında bir paralellik olmadığı düşünüldü.

Meropenem geniş spektrumlu antibakteriyel etkiye sahip parenteral bir karbepenem antibiyotiktir ve renal dehidropeptidaz-I enziminin hidrolitik etkisine karşı stabildir.Gram negatif bakteri hücresindeki periplazmik boşlukta yer alan β-laktamazların hidroliz etkisine direnç gösterir.Sitoplazmik membrandaki hedef proteinlerle etkileşime girer ve önemli hücre duvar bileşiklerinin sentezini bozar. *E.coli*'de PBP-2, meropenemin birincil hedefidir. Meropenemle yapılan çalışmalarda *E. coli*'nin etken olduğu İYE'nda bu antibiyotikle yüksek oranda tedavi sağlandığı ve direnç gelişiminin kullanılan suşlarda hemen hiç gözlenmediği belirtilmektedir (54).Bu yüzden meropenemin adhesiv özelliğe olan etkisinin araştırılmasının doğru bir seçim olacağına inanılarak bu çalışma planladı.Fakat, meropenemin adherensi

azaltmasına rağmen, gentamisin ve tetrasikline göre daha az etkili olması, bu ilacın tedavi yanında profilaksi amacıyla da kullanılabilirliğini çok fazla açıklamadığına inanıldı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

HA deneylerinde elde edilen sonuçları aşağıdaki gibi özetleyebiliriz:

1. Deneylerde kullanılan bütün suşların, MS^+ ve MR^+ adhesinlere sahip olduğu bulundu.

2. Mikrotiter HA deneylerinde test edilen antibiyotiğin HA'nu azaltma yeteneği sub-MICleriyle, kullanılan suşun titresinin doğru orantılı olduğu gözlendi.

3. Bütün antibiyotiklerin 1/4 MIC'lerinde lam HA'ları tamamiyle durduruldu, HA titreleri aşırı şekilde arttı.

4. 1/8 MIC'de ve 1/16 MIC'de HA titrelerini en çok artıran ve lam HA'larını en çok azaltan antibiyotiğin meropenem, olduğu görüldü.

5. Sadece meropenemin 1/8 MIC'inde lam HA 1 suşta (*E.coli-11*) tamamiyle durduruldu.

6. Yalnızca HA deney sonuçlarıyla, meropenemin bakteriyal adherensi azalttığı yargısına varılamayacağı sonucuna varıldı.

7. 1/4 MIC'de ve 1/8 MIC'de adherensi istatistiki olarak en anlamlı oranda azaltan antibiyotiğin gentamisin olduğu belirlendi ($P<0.05$).

8. HA'daki azalışları belirlemek açısından lam HA'nunun mikrotitre HA deneyinden daha az hassas olduğu fakat, sonuçlardaki paralellik, lam HA'nun daha basit ve daha az zaman isteyen bir yöntem olduğunu ortaya koydu.

Öneriler: Antibiyotiklerin HA titrelerine ve adherense olan etkilerinin incelenmesi bakterilerin mukoza yüzeyleriyle olan etkileşimlerini anlamada yardımcı olabileceğine fakat, HA, piliasyon ve adherens olaylarının her bakteride farklı oranlarda meydana geldiği görüldü.

Özellikle trimetropim olmak üzere çalışılan birçok antibiyotiğin HA ve adherense olan etkileri ispat edilmiştir ve birçoğunun HA ve adherensi doza bağlı

olarak azalttığı ortaya çıkarılmıştır.Bakteri ile mukoza arasındaki ligand-reseptör ilişkisinin bozulmasıyla profilaksi ve tedaviye yardım sağlanacağı tezi birçok çalışmada öne sürülmektedir (44,46,47,55).Bu çalışmada yeni kullanıma girecek, karbepenem bir antibiyotik olan meropenemin HA ve adherens üzerine olan azaltıcı etkilerine bakarak, *E.coli*'nin etken olduğu İYE'larında özellikle profilaksi amacıyla da kullanılabileceği önerisinin yapılamayacağı kanaatine varıldı. Çünkü, ilacın sublethal konsantrasyonda HA aktivitesini ve in vitro olarak, adherensi doza bağlı olarak azalttığı gerçeği yanında ilacın üroepitelyal hücrelerde de in vivo olarak adherensi azalttığı klinik olarak ispat edilmesi gerektmektedir. Bunun için meropenem kullanmakta olan İYE'lu hastalardan izole edilmiş üroepitel hücrelerle adherens deneyleri yapılması gerekmektedir. Bunun yanında ilaç hangi dozlarda kullanıldığında idrarda ve dolayısıyla renal dokularda adherensi azaltabilecek sublethal konsantrasyonlara ulaştığının tespit edilmesi gerekmektedir.

7. ÖZET

Hemaglütinasyon teknikleri bakteriyel yapışmanın anlaşılması için pratik bir in vitro metod olarak sık sık önerilmektedir. İdrar yolu infeksiyonlarından izole edilmiş mannoz-rezistant adhesinler tarafından aracılık edilen bu yapışma, antibiyotiklerin sub-MIC'leriyle etkilenebilir.

Yeni bir karbepenem antibiyotik olan meropenem, 1/16 dan 1/4 MIC'e kadar olan aralıktaki subletal konsantrasyonlarda lam hemaglütinasyon derecelerindeki azalışa, hemaglütinasyon titrelerindeki artışa ve insan yanak mukoza hücre epitellerine yapışmasındaki azalışa bağlı olarak, gentamisin ve tetrasiklinle karşılaştırıldı.

Üç antibiyotiğin hepsi, iki suşun (*E.coli-11* ve *E.coli-36*) lam hemaglütinasyon derecelerinin +4'ten (kontrol) 0'a (1/4 MIC) ve iki suşun +3'ten (kontrol) 0'a (1/4 MIC) inhibisyonuna neden oldu. Diğer iki antibiyotik olan gentamisin ve tetrasiklinle karşılaştırıldığında, yalnızca meropenem 1 suşun (*E.coli-11*) lam hemaglütinasyonunun 1/8 MIC'de +4'ten (kontrol) 0'a (1/8 MIC) inhibisyonuna neden oldu ve hatta 1/16 MIC'de test edilen bütün suşların lam hemaglütinasyonlarında önemli azalışlar meydana getirdi. Aynı zamanda, mikrotitre hemaglütinasyon deneylerinin lam hemaglütinasyonlarıyla benzer sonuçlar gösterdiği kararına varıldı.

Sonuçlarımız, sublethal konsantrasyonlarda (1/16-1/4 MIC) meropenemin çarpıcı şekilde hemaglütinasyon aktivitesini azalttığını göstermektedir.Bununla beraber, bütün sublethal konsantrasyonlarda (1/8-1/4 MIC) 4 suşun insan yanak mukoza hücrelerine adherensini anlamlı ölçüde azalttığından dolayı, diğer iki antibiyotik olan meropenem ve tetrasiklinle karşılaştırıldığında, gentamisin yapışmayı azaltma açısından en etkili ajan olmuştur ($P<0.05$).

Sonuçta, sadece hemaglütinasyon deneyleriyle, meropenemin idrar yolu infeksiyonlarının profilaksisinde kullanılmasına karar verilmeyeceğine inandık.Bu in vitro deneylerin daha ileri in vivo klinik araştırmalarla desteklenmesi gerektiği önerilebilir.

8. SUMMARY

Hemagglutination techniques have often been proposed as practical in vitro methods for the assesment of bacterial adhesiveness. This adherence, which is usually mediated by mannose-resistant adhesins in *E.coli* strains isolated from urinary tract infections, may be affected by sub-MICs of antibiotics.

Meropenem, a new carbapenem antimicrobial, was compared to gentamicin and tetracycline depending on decrease of the slide hemagglutination grades, increase of the hemagglutination titers, and decrease of adherence levels of human buccal epithelial cells in sublethal concentrations ranging from 1/16 to 1/4 of the MIC.

All three antibiotics caused inhibition of slide hemagglutination grades from 4+ (control) to 0 (1/4 MIC) for two strains (*E.coli-11* and *E.coli-36*) and from 3+ (control) to 0 (1/4 MIC) for two strains (*E.coli-9* and *E.coli-29*). As compared to the other two antibiotics, gentamycin and tetracycline only meropenem produced inhibition of the slide hemagglutination grade from +4 (control) to 0 (1/8 MIC) for one strain (*E. coli-11*) at 1/8 of the MIC and also produced significant decrements of slide hemaglutination grades at 1/16 of the MIC for all strains tested. It was also concluded that microtiter hemagglutination assays exhibited related results to slide hemagglutinations.

The results show that at sublethal concentrations (1/16-1/4 MIC), meropenem markedly decreased hemagglutination activities of four strains. However, gentamicin was the most effective agent for decreasing adhesiveness, since gentamicin meaningfully decreased adherence of four strains to human buccal cells at all sublethal concentrations (1/8-1/4 MIC) as compared to the other two antibiotics, meropenem and gentamicin ($P<0.05$).

It was consequently believed that hemagglutination assays may not be used by itself to decide the use of meropenem in the prophylaxis of urinary tract infections.It may be suggested that in vitro assays should be clinically supported by further in vivo investigations.

9. KAYNAKLAR:

1- Holmes, B., and Gross, R. J.: Coliform bacteria; various other members of the *Enterobacteriaceae* appeared in: Principles of Bacteriology, virology and immunity: Parker, M. T., Collier, L. H., Duerden, B. I., (Ed): London Melborne Auckland, (eight ed), p., 416, 1990.

2- Roberts, R.B., Abelson, D.B., Cowie, D. B., Bolton, E. T., and Britten, R. J.: Studies of biosynthesis in *Escherichia coli.* Carnegie Inst Wash Publ, 607: 1-521, 1955 appeared in: Neidhardt F. C.: Chemical Composition of *Escherichia coli*: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, B. L., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umbarger, H. E. (Ed): ASM Washington, D.C. U.S.A., (First ed), *1*: p., 3, 1987.

3- Neidhardt F. C.: Chemical composition of *Escherichia coli*: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, B. L., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umbarger, H. E. (Ed): ASM Washington, D.C. U.S.A., (First ed), *1*: p., 3, 1987.

4- Holt, J. G., Krieg, N. R., A. Sneath, P. H., Staley, J. T., Williams, S. T.: Facultatively anaerobic gram-negative rods appeared in: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology: Baltimore, Maryland USA (Ninth Ed.) p., 179, 1990.

5- De Graf, F. K., Mooi, F. R.: The fimbrial adhesins of *Escherichia coli.* Adv Microb Physiol, *28*: pp 65-143,1986.

6- Siitonen, A.,: *Escherichia coli* in fecal flora of healthy adults: Serotypes, P and type 1C fimbriae, non-P mannose-resistant adhesins, and hemolytic activity. J Infect Dis, *166*: pp 1058-1065,1992.

7- Wold, A. E., Caugant, D. A., Lidin-Janson, G., De Man, P., and Svanborg, C.: Resident colonic *Escherichia coli* strains frequently display uropathogenic characteristics. J Infect Dis, *165*: pp 46-52, 1991.

8- Lupski, J. M., and Feign, R. D.: Molecular evolution of pathogenic *Escherichia coli.* J Infect Dis, *157*: pp 1120-1123, 1988.

9- Quadri, F., Haque, A., Faruque, S. M., Bettelheim, K. A., Robins-Browne, R., and Albert, M. J.: Hemagglutinating properties of enteroaggregative *Escherichia coli.* J Clin Microbiol, *32*: pp 510-514, 1994.

10- Yoh, M., Narita, I., Honda, T., Miwatani, T., and Nishibuchi, M.: Comparison of preservation methods for enterotoxigenic *Escherichia coli* producing heat-labile enterotoxin. J Clin Microbiol, *29*: pp 2326-2328, 1991.

11- Caprioli, A., Luzzi, I., Rosmini, F., et al.: Hemolytic-Uremic Syndrome and cytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in Italy. J Infect Dis, *166*: pp 154- 58, 1992.

12- Mariani-Kurkdjian, P., Denamur, E., Milon, A., et al.: Identification of clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of Hemolytic-Uremic Syndrome in France. J Clin Microbiol, *31*: pp 296-301, 1993.

13- Chinyu Su, M. D., and Lawrence J. Brand, M. D.: *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. Ann Intern Med, *123*: pp 698-714, 1995.

14- Greatores, J. S., and Thorne, G. M.: Humoral immune responses to shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in Hemolytic-Uremic Syndrome patients and healthy subjects. J Clin Microbiol, *32*: pp 1172-1178, 1994.

15- Caprioli, A., Luzzi, I., Rosmini, F., et al.: Communitywide outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli.* J Infect Dis, *169*: pp 208-211, 1993.

16- Kallenius, G., Svenson, S. B., Mollby, R., Cedergren, B., Hultberg, H., Winberg, J.: Structure of carbohydrate part of receptor on human uroepithelial cells for pyelonephritogenic *Escherichia coli.* Lancet, *ii*: pp 604-606, 1981.

17- Rota, S., Kuştimur, S., Türet, S., ve Gülsayın, C.: İdrar yolu infeksiyonu yapan*Escherichia coli*'lerin mannoz-sensitif (MS) ve mannoz-rezistan (MR) adezinleri bakımından incelenmesi. İnfeksiyon Dergisi, *4* (4): s. 563-570, 1990.

18- Domingue, G. J., Roberts, J. A., Laucirica, R., et al.: Pathogenic significance of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. J Urol, *133*: pp 983-989, 1984.

19- Johnson, J. R., Ørskov, I., Ørskov, F., et al.: O, K, and H antigens predict virulence factors, carboxylesterase B pattern, antimicrobial resistance, and host compromise among *Escherichia coli* strains causing urosepsis. J Infect Dis, *169*: pp 119-126, 1993.

20- Yamamoto, T., Fujita, K., and Yokota, T.: Adherence characteristics to human small intestinal mucosa of *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea or urinary tract infections. J Infect Dis, *162*: pp 896-908, 1989.

21- Evans JR, D., Evans, D. G., Diaz, S. R., and Graham, D. Y.: Mannose-resistant hemagglutination of human erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* with Colonization Factor Antigen II. J Clin Microbiol, *26*: pp 1626-1629, 1988.

22- Bratoeva, M. P., Wolf, M. K., Marks, J. K., and Cantey, J. R.: A case of diarrhea, bacteremia, and fever caused by a novel strain of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol, *32*: pp 1383-1386, 1994.

23- Plos, K., Connell, H., Jodal, U., et al.: Intestynal carriage of P fimbriated *Escherichia coli* and the susceptibility to urinary tract infection in young children. J Infect Dis, *171*: pp 625-631, 1994.

24- Jacobson, S. H., Kallenius, G., Lins, L-E., and Svenson, S. B.: Symptomatic recurrent urinary tract infections in patients with renal scarring in relation to fecal colonization with P-fimbriated *Escherichia coli*. J Urol, *137*: pp 693-696, 1986.

25- Schlager, T. A., Whittam, T. S., Hendley, J. O., et al.: Comparison of expression of virulance factors by *Escherichia coli* causing cystitis and *E. coli* colonizing the periurethra of healthy girls. J Infect Dis, *172*: pp 772-777, 1995.

26- Marre, R., Kreft, B., and Hacker, J.: Genetically engineered S and F1C fimbriae differ in their contribution to adherence of *Escherichia coli* to cultured renal tubuler cells. Infect Immun, *58*: pp 3434-3437, 1990.

27- Lichodziejewska, M., Topley, N., Steadman, R., Mackenzie, R. K., Jones, K. V., Williams, J. D.: Variable expression of P fimbriae in *Escherichia coli* urinary tract infection. Lancet, *ii*: pp1414-1417, 1989.

28- Vaisanen, V., Elo, J., Tallgren, L.G., et al.: Mannose-resistant haemagglutination and P antigen recognition are characteristic of Escherichia coli causing primary pyelonephritis. Lancet, *ii*: pp 1366-1369, 1981.

29- Kisielius, P. V., Schwan, W. R., Amundsen, S. K., Duncan, J. L., and Schaeffer, A. J.: In vivo expression and variation of *Escherichia coli* type 1 and P pili in the urine of adults with acute urinary tract infections. Infect Immun, *57*: pp 1656-1662, 1989.

30- Westerlund, B., Siitonen, A., Elo, J., Williams, P. H., Korhonen, T. K., and Makela, P. H.: Properties of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in boys. J Infect Dis, *158*: pp 996-1002, 1988.

31- Donnenberg, M. S., Newman, B., Utsalo, S. J., Trifillis, A. L., Hebel, J. R., and Warren, J. W.: Internalization of *Escherichia coli* into human kidney epithelial cells: comparison of fecal and pyelonephritis-associated strains. J Infect Dis, *169*: pp 831-838, 1994.

32- Kallenius, G., Winberg, J.: Bacterial adherence to periurethral epithelial cells in girls prone to urinary-tract infections. Lancet, *ii*: 540-543, 1978.

33- Stamm, W. E., Hooton, T. M., Johnson, J. R., et al.: Urinary tract infections: From pathogenesis to treatment. J Infect Dis, *159*: pp 400-406, 1989.

34- Foxman, B., Zhang, L., Palin, K., Tallman, P., and Marrs, C. F.: Bacterial virulance characteristics of *Escherichia coli* isolated from first-time urinary tract infection. J Infect Dis, *171*: pp 1514-1521, 1995.

35- Lomberg, H., Hellström, K., Jodal, U., Ørskov, I., Svanborg-Eden, C.: Properties of *Escherichia coli* in patients with renal scarring. J Infect Dis, *159*: pp 579-581,1989.

36- Crokaert, F., Lismont, M-J., Van der Linden, M-P., and Yourassowsky, E.: Determination of serum bactericidal activity against *Escherichia coli* by an automated photometric method. J Clin Microbiol, *26*: pp 2069-2076, 1988.

37- Kunin, C. M., Hua Hua, T., Krishnan, C., and Van Arsdale White, L.: Do temperature-sensitive auxuthrops of *Escherichia coli* have special virulance? J Clin Microbiol, *31*: pp 47-49, 1993.

38- Pere, A., Nowicki, B., Saxen, H., Siitonen, A., and Korhonen, T. K.: Expression of P, type-1, and type-1C fimbriae of *Escherichia coli* in the urine of patients with acute urinary tract infection. J Infect Dis, *156*: pp 567-574, 1987.

39- Svanborg-Eden, C., Hanson, L. A., Jodal, U., Lindberg, U., Sohl Akerlund, A.: Variable adherence to normal human urinary tract epithelial cells of *Escherichia coli* strains associated with various forms of urinary tract infections. Lancet, *ii*: pp 490-492, 1976.

40- Jantausch, B. A., Wiedermann, B. L., Hull, S. I., Nowicki, B., et al.: *Escherichia coli* virulance factors and ^{99m}Tc-dimercaptosuccinic acid renal scan in children with febrile urinary tract infection. Pediatr Infect Dis J, *11*: pp 343-349, 1992.

41- Virkola, R., Westerlund, B., Holthöfer, H., Parkkinen, J., Kekomaki, M., and Korhonen, T. K.: Binding characteristic of Escherichia coli adhesins in human urinary bladder. Infect Immun, *56*: pp 2615-2622, 1988.

42- Hornick, D. B., Allen, B. L., Horn, M. A., and Clegg, S.: Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol, *29*: pp 1795-1800, 1991.

43- Vaissanen, V., Korhonen, T. K., Jokinen, M., Gahmberg, C. G., Ehnholm, C.: Blood group M specific haemagglutinin in pyelonephritogenic *Escherichia coli*. Lancet, *ii*: p., 1192, 1982.

44- Lomberg, H., Hanson, L. A., Jacobbson, B., Jodal, U., Leffler, H., Svanborg-Eden, C.: Correlation of P blood group, vesicoureteral reflux, and bacterial attachment in patients with recurrent pyelonephritis. N Engl J Med, *308*: pp 1189-1192, 1983.

45- Kist, M. L., Salit, I. E., and Hofmann, T.: Purification and characterization of the Dr hemagglutinins expressed by two uropathogenic *Escherichia coli* strains. Infect Immun, *58*: pp 695-702, 1990.

46- Arthur, M., Campanelli, C., Arbeit, R. D., et al.: Structure and copy number of gene clusters related to the *pap* P-adhesin operon of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun, *57*: pp 314-321, 1989.

47- Stapleton, A., Moseley, S., and Stamm, W. E.: Urovirulance determinants in Escherichia coli isolates causing first-episode and recurrent cystitis in women. J Infect Dis, *163*: pp 773-779, 1990.

48- Stenqvist, K., Sandberg, T., Ahlstedt, S., Korhonen, T. K., and Svanborg-Eden, C.: Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics and antibodies on the adherence of Escherichia coli to human uroepithelial cells in vitro. Scand J Infect Dis, Suppl *33*: pp 104-107, 1982.

49- Lorian, V., Gemmel, C.G.: Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: Effects on ultrastructure, virulance, and susceptibility to immunodefenses appeared in: Antibiotics in Laboratory Medicine: Lorian, V.: Baltimore, Maryland USA (Third Ed.), pp 539-541, 1991.

50- Klein, U., Pawelzik, M., Opfekuch, W.: Influence of β-lactam antibiotics and vancomycin on the adherence (hemagglutination) of *Escherichia coli*-containing different adhesins. Chemotherapy, *31*: pp 138-145, 1985.

51- Dean, E. A., and Kessler, R. E.: Quantitation of effects of subinhibitory concentrations of trimethoprim on P fimbria expression and in vitro adhesiveness of uropathogenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol, *26*: pp 25-30, 1988.

52- Kovarik, J. M., Hoepelman, I. M., and Verhoef, J.: Influence of fluoroquinolones on expression and function of P fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, *33*: pp 684-688, 1989.

53- Vosbeck, K., Bohn, J., and Huber, U.: Adhesiveness, hemagglutination and piliation of *Escherichia coli* grown in sub-MIC concentrations of antibiotics. Experientia *36*: p., 494, 1980.

54- Pryka, R. D., and Haig, G. M.: Meropenem: A new carbapenem antimicrobial. Ann Pharmacother, *28*: pp 1045-1054, 1994.

55- Reid, G., Bruce, A. W., and Beheshti, M: Effect of antibiotic treatment on receptivity of uroepithelial cells to uropathogens. Can J Microbiol, *34*: pp 327-331, 1988.

DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ÖZGEÇMİŞ

O.Birol ÖZGÜMÜŞ,1969 yılında Rize'nin Pazar ilçesinde doğdu. İlk,Orta ve Lise tahsilini Pazar'da tamamladı.K.T.Ü.Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 1992 yılında bitirdi.ve Biyolog ünvanı aldı.1992-1993 Eğitim-Öğretim yılında K.T.Ü Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.1994-1996 yıllarında aynı Enstitünün aynı Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.