

## ÜRİNER SİSTEM İNFEKSİYONLARINDAN ETKEN OLARAK İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARINDA HEMAGLÜTİNASYON VE HEMOLİZİN ÜRETİMİ

Işıl FİDAN\*, Sevgi YÜKSEL\*, A. Bilge SİPAHİ\*, Semiha ÖZKAN\*\*, Nedim SULTAN\*

\* Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

\*\* Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

### ÖZET

*Escherichia coli*, idrar yolu infeksiyonlarından sık olarak izole edilen bir patojendir. *E.coli*'nin üriner epitelde kolonizasyonunu ve persistansını kolaylaştıracak virülans faktörleri vardır. Bu çalışmada, üriner sistem infeksiyonundan etken olarak izole edilen *E.coli* suşlarında hemagglütinasyon ve hemolizin üretiminin rolü ve önemi, asemptomatik bakteriürlü kişilerden izole edilen suşlarla karşılaştırılarak araştırılmıştır. Asemptomatik bakteriürlü kişilerden izole edilen *E.coli* suşlarında hemolizin üretimi % 34, insan eritrositlerinde mannoza dirençli hemagglütinasyon % 14 iken, bu iki oran piyelonefritli hastalardan izole edilen suşlarda % 83 ve % 90, sistitli hastalardan izole edilen suşlarda % 55 ve % 30 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, hemagglütinasyon ve hemolizin üretiminin idrar yolu infeksiyonundan izole edilen *E.coli* suşlarının önemli virülans faktörleri arasında olduğu yinelenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Escherichia coli*, hemagglütinasyon, hemolizin

### SUMMARY

#### Haemagglutination and Haemolysin Production of *Escherichia coli* Isolates from Urinary Tract Infections

*Escherichia coli* is the most common pathogen isolated from urinary tract infections. *E.coli* has virulence factors that facilitate their colonization and persistence in the urinary epithelium. In this study, the role and importance of haemagglutination and haemolysin production in *E.coli* isolates from urinary tract infections were investigated and compared with the results of strains isolated from asymptomatic bacteriuria cases. While the ratio of haemolysin production was 34 % and ratio of mannose-resistant haemagglutination of human erythrocytes was 14 % in *E.coli* strains isolated from asymptomatic bacteriuria cases, these two ratios were found as 83 % and 90 % in strains isolated from pyelonephritis cases, and 55 % and 30 % in strains isolated from cystitis cases. In conclusion, it was supported that haemagglutination and haemolysin production are among the important virulence factors of *E.coli* isolates from urinary tract infections.

**Keywords:** *Escherichia coli*, haemagglutination, haemolysin

---

**Yazışma adresi:** Işıl Fidan, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Tel.: (0312) 202 46 26

e-posta: isilfidan@yahoo.com

Alındığı tarih: 29.07.2005; revizyon kabulü: 24.11.2005

## GİRİŞ

Üriner sistem infeksiyonları klinikte en fazla rastlanan infeksiyonlardandır<sup>(2)</sup>. *Escherichia coli* suşları, akut piyelonefrit ve tekrarlayan idrar yolu infeksiyonlarından sık olarak izole edilmektedir. *E.coli*'nin virülans faktörlerinden en önemlisi yapışma (aderens) özelliğidir<sup>(17)</sup>. Virülans faktörleri, *E.coli* suşlarının selektif olarak üroepitelyal mukozada kolonize olmalarını sağlayarak inflamatuvar yanıt oluşturur ve sonunda alt üriner yoldan renal kaviteye ilerlemesine neden olur<sup>(3)</sup>. Ayrıca konak hücre invazyonu, *E.coli* suşlarının konak savunmasından kaçmasına ve renal dokuya yayılımına neden olur<sup>(11)</sup>. *E.coli*'nin hücre dışına salgılanan en önemli virülans faktörü hemolizindir. Barsak dışı infeksiyonlardan izole edilen *E.coli* suşlarının yarım doz hemolizin salgılayıcı ve hemolizin sitotoksik etkilidir<sup>(4)</sup>.

*E.coli*'nin hücre yüzey virülans faktörleri çeşitli adezinleri içerir. Bunlar esas olarak fimbriyal kaynaklıdır. Fimbriya üreten *E.coli* suşları konak dokuya invaze olmalarını kolaylaştıracak farklı matriks yapılarına bağlanma özelliğindedirler. *E.coli* suşlarında Tip I fimbriya ve P, S, X faktörü (Dr hemagglütinin) içeren Tip II fimbriya gibi konak hücreye adezyonda etkili yüzey yapıları bulunur<sup>(12)</sup>. Bunlar epitel hücrelerine bakteriyel adezyonu, invazyonu ve biyofilm oluşumunu artırır. Eritrositler, fimbriya benzeri yüzey reseptörleri içerdiğinden, fimbriya bulunan *E.coli* suşları ile hemagglütinasyon oluştururlar<sup>(8)</sup>. Hemagglütinasyon, *E.coli* fimbriyalarının tiplendirilmesinde kullanılır. Tip I fimbriya (MS-mannoz sensitive) nonpatojenler de dahil pek çok *E.coli* suşunda bulunur, 'ortak pili' olarak adlandırılır, mannoz içeren reseptörlerle reaksiyona girer ve eritrosit süspansiyonuna mannoz eklendiğinde hemagglütinasyon inhibe edilir<sup>(3)</sup>. Buna mannoza duyarlı hemagglütinasyon (MSHA) denir. Non-tip I (Tip II=MR-mannoz resistant) fimbriyalar ise mannoz içermeyen reseptörlerle etkileşir ve mannoz bulunan ortamda hemagglütinasyon önlenmez. Bu durum mannoza dirençli hemagglütinasyon (MRHA) olarak adlandırılır<sup>(8)</sup>. Bu nedenle mannoza dirençli hemagglütinasyon, Tip I fimbriya dışında fimbriya bulunduran bakterileri ayırt etmede basit, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Mannoza dirençli hemagglütinasyondan sorumlu olan P-fimbriyanın akut piyelonefrit gelişiminde major bir virülans faktörü olduğu düşünülmektedir<sup>(1,13)</sup>.

Bu çalışmada idrar yolu infeksiyonundan izole edilen *E.coli* suşlarında virülans faktörlerinden hemolizin üretimi ve eritrositlerle hemagglütinasyon oluşumunun araştırılarak, klinik tanımlarla karşılaştırılması ve ayrıca mannoza duyarlı ve mannoza dirençli hemagglütinasyonun tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Bakteriyel izolatlar:

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen idrar örneklerinden izole edilen, konvansiyonel ve otomatize yöntemlerle *E.coli* oldukları belirlenen 105 suş çalışma kapsamına alınmıştır. Kullanılan *E.coli* suşlarından 23'ü piyelonefrit tanısı konmuş hastalardan, 47'si sistit tanısı ile izlenen hastalardan ve 35'i de asemptomatik bakteriyüri olan hastalardan izole edilmiştir.

### Hemolitik aktivite:

Hemolizin üretimi % 5 koyun kanlı agar (Oxoid) besiyerinde araştırılmıştır. Triptik soy agar (TSA) besiyerinde subkültürü yapılan bakteri steril öze ile % 5 koyun kanlı agar besiyerine ekilmiş, 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra, koloni etrafında oluşan en az 1 mm genişliğinde hemolitik zon bulunan suşlarda hemolizin üretimi olduğu kaydedilmiştir<sup>(6,17)</sup>.

### Hemagglütinasyon yöntemi:

Tüm *E.coli* suşları jeloz besiyerinde (Difco) 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda McFarland 0.5'e göre hazırlanan bakteri süspansiyonundan iki ayrı lama 20 µl alınmış, birinci lamda bulunan bakteri süspansiyonu üzerine fosfat tamponu (PBS) içinde hazırlanmış % 2'lik O grubu insan eritrosit süspansiyonundan, ikinci lamda bulunan bakteri süspansiyonu üzerine de PBS içinde hazırlanmış ve % 5 D-mannoz (Sigma) içeren % 2'lik O grubu insan eritrosit süspansiyonundan 20 µl eklenmiştir<sup>(8)</sup>. Lamlar üzerinde eritrosit ve bakteri süspansiyonu karıştırılmış, 5 dakika rotatorda çevrilmiş ve sonra çıplak gözle agglütinasyon okunmuştur. % 5 D-mannoz içermeyen birinci lamdaki eritrosit süspansiyonu ile oluşan agglütinasyonun, % 5 D-mannoz içeren eritrosit süspansiyonu eklenen ikinci lamda da inhibe olmayarak devam etmesi durumunda, mannoza dirençli hemagglütinasyon (MRHA) pozitif olarak değerlendirilmiştir<sup>(15)</sup>. Birinci lamda oluşan agglütinasyonun % 5 D-mannoz bulunan ikinci lamda inhibe olması durumunda, mannoza duyarlı hemagglütinasyon (MSHA) pozitif olarak değerlendirilmiştir. Kontrol olarak PBS içinde bakteri ve PBS içinde eritrosit süspansiyonu kullanılmıştır<sup>(14)</sup>.

### İstatistiksel analiz:

Sonuçların, incelenen suşların izole edildiği klinik durumlara göre karşılaştırılmasında ki-kare testi (Yates düzeltmesi ile) uygulanmıştır.

## BULGULAR

İncelenen 105 *E.coli* suşundan 57'sinde (% 54) hemolizin varlığı, 55'inde (% 52) pozitif hemagglütinasyon reaksiyonu belirlenmiştir. *E.coli* suşlarının izole edildiği klinik tablolara göre hemolizin üretimi ve hemagglütinasyon özelliği ile ilgili sonuçlar tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1:** *E.coli* suşlarında hemolizin yapımı ve hemagglütinasyon (mannoza dirençli ve duyarlı) özelliklerinin klinik tabloya göre dağılımı.

Tanı (n)	Hemolizin pozitif	Hemagglütinasyon pozitif	MRHA*	MSHA*
Piyelonefrit(23)	19 (% 83)	21 (% 91)	19 (% 90)	2 (% 10)
Sistit(47)	26 (% 55)	27 (% 57)	8 (% 30)	19 (% 70)
Aseptomatik bakteriüri(35)	12 (% 34)	7 (% 20)	1 (% 14)	6 (% 86)
Toplam(105)	57 (% 54)	55 (% 52)	28 (% 51)	27 (% 49)

\* Hemagglütinasyon pozitif suşlara göre sayı ve %.

Hemagglütinasyon pozitif olan 55 *E.coli* suşundan 28'inde (% 51) D-mannoz eklenmesinden sonra hemagglütinasyonun devam etmesi ile MRHA pozitif olduğu, 27'sinde (% 49) ise MSHA pozitifliği belirlenmiştir. Böylece incelenen tüm *E.coli* suşlarında MRHA pozitifliği % 27, MSHA pozitifliği ise % 26 olarak belirlenmiştir.

Bulgulardaki farklılıkların istatistiksel değerlendirmesi tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2:** Bulguların istatistik değerlendirmesi (farkların p değeri).

Suşların kaynağı	Hemolizin oluşturma	Hemagglütinasyon oluşturma	MRHA
Piyelonefrit-aseptomatik bakteriüri	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Piyelonefrit-sistit	<b>0.018</b>	<b>0.0095</b>	<b>0.000</b>
Sistit-aseptomatik bakteriüri	0.09	<b>0.001</b>	0.09

## TARTIŞMA

*E.coli* suşlarının pek çok özelliği bu organizmanın patojenitesine katkıda bulunur. Hemolizin üretimi ve eritrositlerle hemagglütinasyon oluşturma bu faktörler arasındadır. İnsanlarda idrar yolu infeksiyonuna yol açan *E.coli* suşlarının üriner sistem epiteline yapışmalarının, infeksiyonun böbreklere ulaşması için en önemli faktör olduğu bildirilmiştir<sup>(16)</sup>. Müköz yüzeylere tutunma ile bakteri, idrar gibi sıvıların temizleyici etkilerine karşı korunabilir. Üst üriner sistem infeksiyonlarına yol açan *E.coli* suşlarının üroepitelyal hücrelere yapışması, insan eritrositlerinde mannoza dirençli hemagglütinasyon oluşumu ile ilişkilidir<sup>(17)</sup>.

Bu çalışmada, hemagglütinasyon oluşumu ve hemolizin üretimi ile virülans arasında bir ilişki olup olmadığının

belirlenmesi için, piyelonefrit, sistit ve asemptomatik bakteriürisi olan hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarında hemolizin üretimi ve hemagglütinasyon oluşturma özellikleri incelenmiş ve 105 klinik *E.coli* suşunun % 52'sinde hemagglütinasyon oluşumu ve % 54'ünde hemolizin üretimi belirlenmiştir. Piyelonefrit oluşturan *E.coli* suşlarının % 91'inde hemagglütinasyon gözlenirken, 19 suşta (% 83) hemolizin üretimi belirlenmiştir. Sistite neden olan suşlarda hemagglütinasyon % 57, hemolizin üretimi % 55; asemptomatik bakteriüriden izole edilen suşlarda ise sırasıyla % 20 ve % 34 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar hemagglütinasyon pozitifliğinin piyelonefrit suşlarında hem sistit (p=0.0095), hem asemptomatik bakteriüri suşlarından (p=0.000), sistit suşlarında ise asemptomatik bakteriüri suşlarından (p=0.001) ileri derecede anlamlı şekilde yüksek olduğunu; hemoliz pozitifliğinin ise piyelonefrit suşlarında asemptomatik bakteri suşlarından ileri derecede anlamlı (p=0.000), sistit suşlarından anlamlı (p=0.018) olarak yüksek olduğunu göstermiştir. Buna göre böbrek infeksiyonu ile hemagglütinasyon oluşumu arasında direkt bir ilişki olduğu ve yine hemolizin üretiminin özellikle üst üriner sistem infeksiyonu oluşumunda etkili olabileceği belirlenmiştir (Tablo 1,2).

Çalışmamızda MRHA varlığı araştırıldığında, hemagglütinasyon pozitif olan ve piyelonefrite yol açan suşlarda % 90 oranında MRHA varlığı gözlenirken, sistit ve asemptomatik bakteriürisi bulunan hastalardan izole edilen suşlarda bu oran sırasıyla % 30 ve % 14 olarak belirlenmiştir. Piyelonefrit suşlarında MRHA yüksekliği diğer iki grup suştan ileri derecede anlamlı (p=0.000) fark göstermektedir. Bu bulguların ışığında idrar yolu infeksiyonu oluşumunda, özellikle üst idrar sisteminin tutulduğu infeksiyonlarda MRHA varlığının önemli bir faktör olduğu belirlenmiştir.

Vranes ve ark.<sup>(17)</sup> piyelonefrit, sistit ve asemptomatik bakteriürisi olan hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarında yaptıkları virülans faktörleri analizinde, hemolizin üretiminde piyelonefritli hastalarda asemptomatik bakteriüri hasta grubuna göre belirgin artış olduğunu, benzer şekilde mannoza dirençli hemagglütinasyon oluşturan P fimbriyanın üretiminin piyelonefrit grubunda daha fazla olduğunu, asemptomatik bakteriürisi bulunan hastalarda ise hiç bulunmadığını belirtmişler, P-fimbriya ve hemolizin üretiminin *E.coli*'ye bağlı üst üriner sistem infeksiyonu oluşturmada çok önemli virülans faktörleri olduğunu bildirmişlerdir.

Green ve Thomas<sup>(6)</sup> idrar yolu infeksiyonundan izole edilen *E.coli* suşlarının % 56'sının insan O grubu eritrositler ile hemagglütinasyon oluşturduğunu, dışkıdan izole edilen *E.coli* suşlarında bu oranın % 17 olduğunu ve idrar yolu infeksiyonlarına neden olan *E.coli* suşlarındaki hemagglütinin varlığının daha fazla olmasının hemagglütininin virülans önemli bir faktör olduğunu gösterdiğini belirtmişlerdir.

Geerlings ve ark.<sup>(5)</sup> asemptomatik bakteriürisi bulunan

diyabetik kadın hastaların idrar örneklerinden izole edilen *E.coli* suşlarında Tip 1 fimbriya üretimini % 86 ve hemolizin üretimini % 32 olarak belirlemiş ve Tip 1 fimbriya üretiminin asemptomatik bakteriürisi bulunan diyabetli kadınlarda yaygın bir virülans faktörü olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızla benzer şekilde Tip 1 fimbriya varlığı en çok asemptomatik bakteriüriye yol açan *E.coli* suşlarında (% 66) belirlenmiştir.

Küçükbaşmacı ve ark.<sup>(10)</sup> üriner sistem infeksiyonundan izole ettikleri *E.coli* suşlarında hemolizin üretimini % 24 olarak belirlemişler ve hemolizin üretimi ile antibiyotik direnci arasında bir bağlantı gösterememişlerdir.

Katouli ve ark.<sup>(9)</sup> da akut sistitli hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarında Tip 1 fimbriya üretimini % 72, MRHA üretimini % 31 ve hemolizin üretimini % 41 olarak bulmuşlardır. Ljungh ve ark.<sup>(11)</sup> idrar yolu infeksiyonundan izole edilen *E.coli* suşlarında hemagglütinasyon oluşumunu % 62, dışkı örneklerinden izole edilen suşlarda % 21 olarak bildirmişlerdir.

Hagberg ve ark.<sup>(7)</sup> piyelonefritli hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarında MRHA üretimini % 77, akut sistitli hastalardan izole edilen suşlarda % 35 ve asemptomatik bakteriürisi olan hastalarda % 18 olarak tespit etmişler ve çalışmamızla uyumlu olarak piyelonefrite yol açan suşlarda MRHA üretiminin daha çok olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak patojenite ile *E.coli* aracılığıyla oluşan hemagglütinasyon arasında yakın bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Böbrek infeksiyonlu hastalardan hemagglütinin ve hemolizin üreten *E.coli* suşu izole etme oranının, mesane infeksiyonlu ve asemptomatik bakteriüri hastalardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla üropatojen *E.coli* suşlarının patogeneğinde, hemolizin ve hemagglütinin üretiminin önemli bir faktör olduğu ve özellikle MRHA varlığının üst üriner sistem infeksiyonu oluşumunda çok önemli bir faktör olabileceği belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Balague C, Fernandez L, Perez J, Grau R: Effect of ciprofloxacin on uropathogenic *Escherichia coli* isolates, *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:401-4.
2. Baskin H, Doğan Y, Bahar IH, Yuluğ N: Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic strains of *Escherichia coli*, *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:79-82.
3. Emody L, Kerenyi M, Nagy G: Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*, *Int J Antimicrob Agents* 2003;22:S29-S33.
4. Erdem B: Enterobacteriaceae, "Ustaçelebi Ş (ed): Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, 1.baskı" kitabında s. 483, Güneş Kitabevi, Ankara (1999).
5. Geerlings SE, Brouwer EC, Gaastra W, Stolk R, Diepersloot RJA, Hoepelman AIM: Virulence factors of *Escherichia coli* isolates from urine of diabetic women with asymptomatic bacteriuria: correlation with clinical characteristics, *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001;80:119-27.
6. Green CP, Thomas VL: Hemagglutination of human type O erythrocytes, hemolysin production, and serogrouping of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis, and asymptomatic bacteriuria, *Infect Immun* 1981;31:309-15.
7. Hagberg L, Jodal U, Korhonen TK, Lidin-Janson G, Lindberg U, Eden CS: Adhesion, hemagglutination and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections, *Infect Immun* 1981;31:564-70.
8. Hernandez F, Caballero M, Rivera P, Hird D: Mannose-resistant hemagglutination, enzyme-linked immunosorbent assay and immune electron microscopy for detection of K99 fimbrial antigen in *Escherichia coli* from calves, *J Clin Microbiol* 1989;27:2123-4.
9. Katouli M, Brauner A, Haghighi LK, Kaijser B, Muratov V, Mollby R: Virulence characteristics of *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in young adults in Iran, *J Infect* 2005;50:312-21.
10. Küçükbaşmacı Ö, Büyükbaba-Boral Ö, Ögüt T, Susever S, Anç-Küçük M, Anç Ö: *Escherichia coli* suşlarında çeşitli antibiyotiklere direncin hemolizin üretimi ve tipleri ile ilişkisi, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003; 33:211-3.
11. Ljungh A, Faris A, Wadström T: Hemagglutination by *Escherichia coli* in septicemia and urinary tract infections, *J Clin Microbiol* 1979;10:477-81.
12. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ: Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells, *EMBO J* 2000;19:2803-12.
13. Mulvey MA: Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*, *Cell Microbiol* 2002;4:257-71.
14. Qadri F, Haque A, Faruque SM, Bettelheim KA, Robins-Browne R, Albert MJ: Hemagglutinating properties of enteroaggregative *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol* 1994;32:510-4.
15. Sasso MD, Culici M, Braga PC: Gemifloxacin: effects of sub-inhibitory concentrations on various factors affecting bacterial virulence, *Int J Antimicrob Agents* 2003;21:325-33.
16. Vaisanen V, Lounatmaa K, Korhonen TK: Effects of sublethal concentrations of antimicrobial agents on the hemagglutination, adhesion, and ultrastructure of pyelonephritogenic *Escherichia coli* strains, *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:120-7.
17. Vranes J, Schönwald S, Sterk-Kuzmanovic N, Ivancic B: Low virulence of *Escherichia coli* strains causing exacerbation of chronic pyelonephritis, *Acta Clin Croat* 2001;40:165-70.