

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Eralp ARIKAN

**İNVİTRO Fe⁺² (DEMİR) SINIRLANDIRILMASININ BAZI
BAKTERİLERİN (S. aureus, S. epidermidis, E. coli, P.
aeruginosa) ÜREMELERİ VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

131789

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Selahattin ATMACA

131789

HAZIRLAYAN

Dr. Gülseren AKTAR

BÖLÜM I

İÇİNDEKİLER

Giriş	1
Genel Bilgiler	3
Materyal ve Metod	7
Bulgular	9
Tartışma	16
Sonuç	21
Özet	22
Summary	23
Kaynaklar	24

GİRİŞ

İnsan vücudundaki total demir (Fe^{+2}) miktarı ortalama 4–5 gramdır. Bunun yaklaşık % 65'i hemoglobinde, % 4'ü miyoglobinde, % 1'i de intrasellüler oksidasyonu kolaylaştıran çeşitli hem bileşiklerinde ve % 0,1'i de kan plazmasında transferrin proteini ile birleşir. Geri kalan % 15–30 kadarı da esas olarak ferritin halinde retiküloendoteliyal hücrelerde ve karaciğer parankim hücrelerinde depolanır. Demir; hemoglobin, miyoglobin, sitokrom oksidaz ve peroksidaz gibi çeşitli maddelerin ve katalaz'ın oluşumunda önemlidir (1).

Besinlerle alınan demirin çoğu ferri (Fe^{+3}) şeklindedir. Demir, ferro (Fe^{+2}) halinde kolaylıkla emilir. Mide salgıları demiri çözer ve Fe^{+2} şeklinde indirgenmesini sağlar. İnce bağırsağın üst kısımlarından Fe^{+2} olarak emilir. Plazma Fe^{+2} taşıma proteini olan transferrini yapmak üzere apotransferrine Fe^{+3} halinde bağlanır(2). Demir globulin molekülü ile gevşek bağlanarak, vücudun herhangi bir noktasındaki bir doku hücresinde serbest hale geçebilir. Kandaki fazla demir vücudun tüm hücrelerinde özellikle karaciğer hepatositlerinde ve daha az oranda da kemik iliğinin RES hücrelerinde birikir. Hücre sitoplazmasında apoferritin proteini ile bağlanarak ferritini yapar. Ferritin şeklinde depolanan demire depo demiri adı verilir(1).

Demir mikroorganizmaların üremesi için gerekli olan esas elementlerden biridir. Bakteriler üreyebilmek için serbest demire ihtiyaç duyarlar, ancak demir omurgalı konaklarda serbest halde bulunmaz, vücutta demir depoları şeklinde transferrin ve ferritin olarak bulunur. Demirin ortamda bulunması bakteriyel enfeksiyonlara duyarlılığı artırır. Enfekte hayvan modeli araştırmalarında da ortamdaki fazla demirin enfeksiyon seyrini değiştirdiği, patojenlerin virulansına katkıda bulunduğu ve demir yakalama mekanizmasına sahip bakterilerin de invazyonunu arttırdığı bildirilmektedir(1,3,4,5).

Serum, çeşitli mikroorganizmaların üremesini engeller. Serumun bakteriyostatik komponentlerinden biri transferrindir. Çünkü majör demir bağlayan protein olan transferrin, ortamdaki serbest demiri bağlar. Serbest demirin transferrin tarafından bağlanmasıyla bakteriyel

nükleoprotein sentezi ve dolayısıyla da bakteri üremesi engellenir (6). Doymamış transferrin, serum ve salgılarda bulunan demiri bağlayarak bakteriyostatik ve bakterisit etkiyi artırır. Doymuş transferrin varlığında ise, ortama demir ilave edilecek olsa bile, demir transferrin'e bağlanamaz ve transferrin'in inhibitör etkisi ortadan kalkar, mikroorganizmaların üremesi kolaylaşır (3).

Bu nedenle; çalışmamızda invitro koşullarda ortamdaki mevcut demir miktarını değişik konsantrasyonlarda bir demir bağlayıcı olan Ethylenediamine-di-o-hydroxyphenol acetic acid (EDDHA; Sigma, E4135, St Louis, U. S. A) maddesi ile sınırlandırarak *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherihia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin üremeleri üzerine etkilerini spektrometrik yöntemle araştırmayı amaçladık.



GENEL BİLGİLER

Demir bakterilerin üremesi için esastır. Ancak doğada ve insan vücudundaki serbest demir miktarı genellikle düşüktür. İnsan vücudunda demir miktarının sınırlandırılmasında laktoferrin, transferrin, hemin gibi demir bağlayıcılarının etkisi vardır(7).

Bakteriler insanda demir kazanımında çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Düşük molekül ağırlığında olan sideroforlar bakterilerin demir bağlayan şelatörleridir. Bazı bakteriler organizmada bulunan transferrin, laktoferrin, ferritin ve hem'i Fe^{+3} kaynağı olarak kullanabilirler, fakat mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Bakteriler için diğer bir demir kazanma yolu konak hücrelerin öldürülmesidir. Bakterilerin toksik proteinlerini salgılamaları düşük Fe^{+2} konsantrasyonunda gerçekleşir. Bakteriler toksik proteinler (enzimler) salgılayarak konak hücrenin ölmesine neden olurlar, dolayısıyla hücre içindeki ferritin serbest kalmış olur(7).

Yüksek yapılı organizmalarda, hem bakteriler makrofajlar tarafından fagosite edilerek mevcut transferrin reseptörlerinin sayısı azaltılır hem de hücre içi ferritin (hücre içi Fe^{+3} depo proteini) konsantrasyonu düşürülür. Bu iki kombine etki ile mevcut demir miktarı azaltılarak mikroorganizmaların üremesi önlenmiş olur. Transferrin ve laktoferrin demiri tutarak bakterilerin organizmada yayılmasını önlerler, bu vücudun savunma mekanizmalarındandır. Bazı durumlarda serbest demir miktarının normalin üzerine çıkması bakteriyel enfeksiyon açısından organizmanın savunma mekanizmasını zayıflatabilir. Yüksek konsantrasyonda serbest demir bakterinin bu demiri kolay kullanmasına ve üreme hızının artmasına yol açar, bunun yanısıra yüksek demir konsantrasyonu polimorfonükleer lökositler ile monositlerin de kemotaktik ve fagositik aktivitelerini azaltır (7).

Organizmada serbest demir konsantrasyonu aşağıdaki durumlara göre artar;

- ❖ Hepatitler,
- ❖ Orak hücreli anemi,

- ❖ Vücut hücrelerinin herhangi bir nedenle parçalanması sonucu hücre içi demir depolarının serbest kalması,
- ❖ Yüksek dozda inorganik demir tabletleri almak,
- ❖ Bol kırmızı et tüketimi,
- ❖ Demirin inhalasyon yoluyla (endüstriyel alanda) alımı,
- ❖ Alkolizm sonucu Karaciğerde Fe birikimi,
- ❖ Günde bir paket sigara tüketimi sonucu vücutta demir'in 1 mg artması(7).

Demirin bütün mikroorganizmaların üremesi için esas olduğu bilinmektedir(8). Dolaşımdaki transferrin'in miktarı demir bağlama özelliğinden dolayı enfeksiyon esnasında oldukça önemli olmaktadır. Serum yaklaşık olarak 3 µg/ml transferrin içermektedir. Transferrin total olarak 4,2 mg Fe⁺³ bağlayabilir. Bundan dolayı transferrin önemli bir demir kaynağı olarak görülür. Mikroorganizmalar demiri yakalamak için transferrinle yarışma kapasitesine sahiptirler. Gönüllülerde yapılan çalışmalarda, bakteriyel enfeksiyon sırasında, enfeksiyonun başlangıcından hemen sonra hem plazma demir düzeylerinin düştüğü görülmüş, hem de karaciğerde depo edilmiş transferrinden demirin uzaklaştığı tespit edilmiştir(9).

Demir yüklenmesi yapılan deney hayvanlarının kontrol grubu hayvanlara nazaran çeşitli patojen mikroorganizmalara daha duyarlı oldukları görülmüş, demir yüklenmesi ile birlikte, *P.aeruginosa*, *L.monocytogenes*, *S.aureus*, *B.anthraxis*, *Y.pestis*, *M.tuberculosis* ve *N.gonorrhoeae* gibi mikroorganizmalarda virulanslarının arttığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Mevcut demirin düşürülmesiyle konakçıda enfeksiyon direncinin arttığı, Fe⁺²- eksik diyetle beslenen deney farelerinin kontrol farelerinden *S.typhimurium* enfeksiyonuna daha az duyarlı oldukları bir başka deneysel çalışmada belirlenmiştir. Serum demir doygunluğunu yükseltmek ya da demir yüklenmesinin canlılarda enfeksiyona yatkınlığın önemli bir nedeni, olarak tespit edilmiştir (3).

İnsan vücudundaki demir intrasellülerdir. Bakterinin demiri kazanımında siderofor gibi demir şelatör bileşikler gereklidir(3). Etkili bakteriyel patojenler konakçıdan demir kazanma

mekanizması yaratırlar. Bu genellikle düşük moleköl ağırlıklı demir şelatör'lerini kapsar ve sideroforlar olarak adlandırılır (10). Sideroforlar çevreden ferrik demiri uzaklaştırıp bakterinin üremesini sağlarlar. Deirdre ve arkadaşları (10); besiyerine demir bağlayıcı ajan olarak EDDHA'yı ilave ederek ortamda demir eksikliği yaratmışlardır. Bu besiyerinde *H.influenzae* tip b'nin üretilmesiyle dış membran protein miktarında artma görülmüştür. EDDHA, Dipy ve 8HQ (8-hydroxyquinoline) gibi demir şelatörlerinin besiyerine eklenmesiyle *Aeromonas salmonicida*'nın, 70-90 kd ağırlığındaki dış membran protein oranında belirgin artışlar meydana geldiği gösterilmiştir (11).

S.typhimurium'un enteroşelin üreten türleri kısmen doymamış transferrin içeren insan serumunda ürerken, enteroşelin negatif türler serumda büyümeleri için eksojen demire gereksinim duyarlar, benzer sonuçlar *E.coli* için de rapor edilmiştir. İleri sürülen kanıtlar enteroşelin gibi siderofor'ların invivo ele alındığında transferrinden demir elde edebilmeyi kolaylaştırdığını göstermiştir (9). Yine tüberküloz basillerinin hücre duvarında bulunan mikobaktin ve *E.coli*'nin dış membranında bulunan enterobaktinin, demir bağlamayı sağlayan ekstrasellüler sideroforların artmasına olanak verdiği yapılan çeşitli deneylerle gösterilmiştir (12).

Yapılan bir çalışmada *N.meningitidis* ve *N. gonorrhoeae*'nin ferrik ve ferrous demir tuzlarını transferrinden alma yeteneği olduğu gözlemlenmiştir. Gonokoklarda konakçıdan demir elde etme mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (13). Serbest demir düzeyi 1 μ M ve 1 mM arasında değiştiğinde *H.influenzae*'nin dış membran proteinlerinde de belirgin değişiklikler gözlenmesine rağmen *H.influenzae*'nin demir kazanımında demirle ilişkili dış membran proteinlerinin önemi henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. *H. influenzae*'nin insan transferrinine bağlı demiri bilinmeyen bir mekanizmayla kazanabildiği rapor edilmiştir (5).

E.coli, *klebsiella*, *enterobakter* gibi bakterilerde bulunan siderofor benzeri aerobaktinlerin bakterilerin üremesini arttırarak invaziv enfeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir (14).

Apatojen bakterilerin genellikle transferrinden demir elde edemediği gösterilmiştir. Esansiyel metalsizlik hızla onların ölümüne neden olduğu halde, patojen bakterilerin duvarlarındaki demir kazanabilen sistem aktivitesiyle ve serum ilave edilmesiyle demir açlıklarının üstesinden gelebildiği gösterilmiştir (12).

İnsan vücudundaki serbest demir konsantrasyonu çok düşük olmasına rağmen, enfeksiyon etkeni bakterilerin büyümeleri için yeterli demiri elde edebilme mekanizmaları önemli bir virulans faktörüdür. Konakçıda; demir ferritin, hemoglobin, transferrin ve laktoferrin gibi depo veya transport proteinlerine bağlıdır. Birçok bakteri siderofor denen küçük organik demir şelatörlerinin sentez ve sekresyonuyla demir alımını sağlayabilmektedir. Sideroforlar Fe^{+3} 'ü yüksek afiniteyle bağlar ve insan demir bağlayıcı proteinleriyle yarışma yeteneğindedir. Ortamda demir azalmasıyla, bakteriler, demir bağlanması yapan ve moleküller için reseptör olarak fonksiyon gören ek dış membran proteinlerinin sentezini artırmaktadırlar. (15).

MATERYAL VE METOD

Bakteri suşları : D.Ü. Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimine değişik kliniklerden gelen materyallerden izole edilen *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli* ve *P.aeruginosa* bakterilerinden 32'ser suş Sceptor sistem ile identifiye edildi.

Besiyerleri : Çalışmada kullanılmak üzere identifiye edilen bakteri suşları katı saklama besiyerinden Tryptic soy agar'a (TSB; Oxoid, CM129, Unipat Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) pasajlanarak +4 °C derecede stoklandı. Çalışma boyunca izole edilen suşlar TSB besiyerine pasajlanarak 0.5×10^7 cfu / ml'ye denk gelecek şekilde serum fizyolojikle ayarlandı.

EDDHA maddesi 0.035 M NaOH de çözüldü. TSB içerisine EDDHA maddesinden 3 ayrı konsantrasyonda (25 , 50, 100 µg/mL) ilave edilerek, 3 farklı konsantrasyonda EDDHA içeren TSB besiyerleri elde edildi. İçerisine hiç EDDHA konulmayan TSB kontrol besiyeri olarak kabul edildi

Üreme ile ilgili absorbands değerlerinin ölçülmesi : Ölçüm esnasında steril mikrokuyucuklar ihtiva eden pleytler kullanıldı. Her bir mikrokuyucuğa 70 µl 4 farklı EDDHA konsantrasyonu içeren (TSB25, TSB50 ve TSB100µg/mL) besiyerleri konulduktan sonra her bir kuyucuğa 10 µl bakteri süspansiyonlarından ilave edildi. İçerisine EDDHA katılmamış TSB besiyeri kontrol kabul edilerek, 3 farklı besiyeri ortamı içinde (TSB 25, TSB 50, TSB 100µg/mL) her bir bakteri türleri iki farklı zaman aralığında (24 ve 48 saat) 37 °C'de enkübe edildikten sonra üreme absorbands değerleri 480 nm dalga boyunda ELISA okuyucusu ile spektrometrik olarak ölçümler yapıldı.

İstatistik değerlendirme : Konsantrasyon farkı gözetmeksizin EDDHA'lı ortamda üreyen *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli*, *P.aeruginosa* bakterilerinin absorbands değerleri wards metodu ile incelendi.

Ayrıca herbir bakteri için farklı EDDHA konsantrasyonlarında (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml) 24 ve 48 saatlik üreme hızlarının sonuçları kendi aralarında Newman-Keuls testi ile değerlendirildi.



BULGULAR

Her bir bakterinin kontrol hariç, diğer üç konsantrasyondan (25, 50, 100 µg/ml EDDHA) elde edilen toplam absorbans değerleri karşılaştırıldığında *S.aureus* ve *S.epidermidis* suşlarının yaklaşık olarak % 74 oranında benzerlik gösterdiği belirlenirken, *E.coli* ile bu iki gram pozitif kok üyesi arasında yaklaşık olarak % 53 oranında bir benzerlik olduğu görüldü. Farklı EDDHA konsantrasyonlarından elde edilen absorbans değerleri açısından *P.aeruginosa*'nın, diğer üç bakteri ile hiçbir benzerlik göstermediği istatistiksel olarak saptandı. Wards metodu ile yapılan bu istatistiki karşılaştırma Şekil 1'de gösterilmiştir.

Çalışmada *S.aureus* suşlarının iki farklı zaman diliminde (24 ve 48 saat) kontrol ve farklı konsantrasyonda EDDHA içeren besiyerlerinde elde edilen absorbans değerleri birbirleriyle karşılaştırıldığında; 24 saatlik enkübasyonda konsantrasyonlar arasında fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). 48 saatlik enkübasyonda ise 25 µg/ml EDDHA içeren TSB'de artış olduğu ve konsantrasyon arttığında *S. aureus*'un üremesinin azaldığı ($p<0.001$) saptandı (Tablo 1).

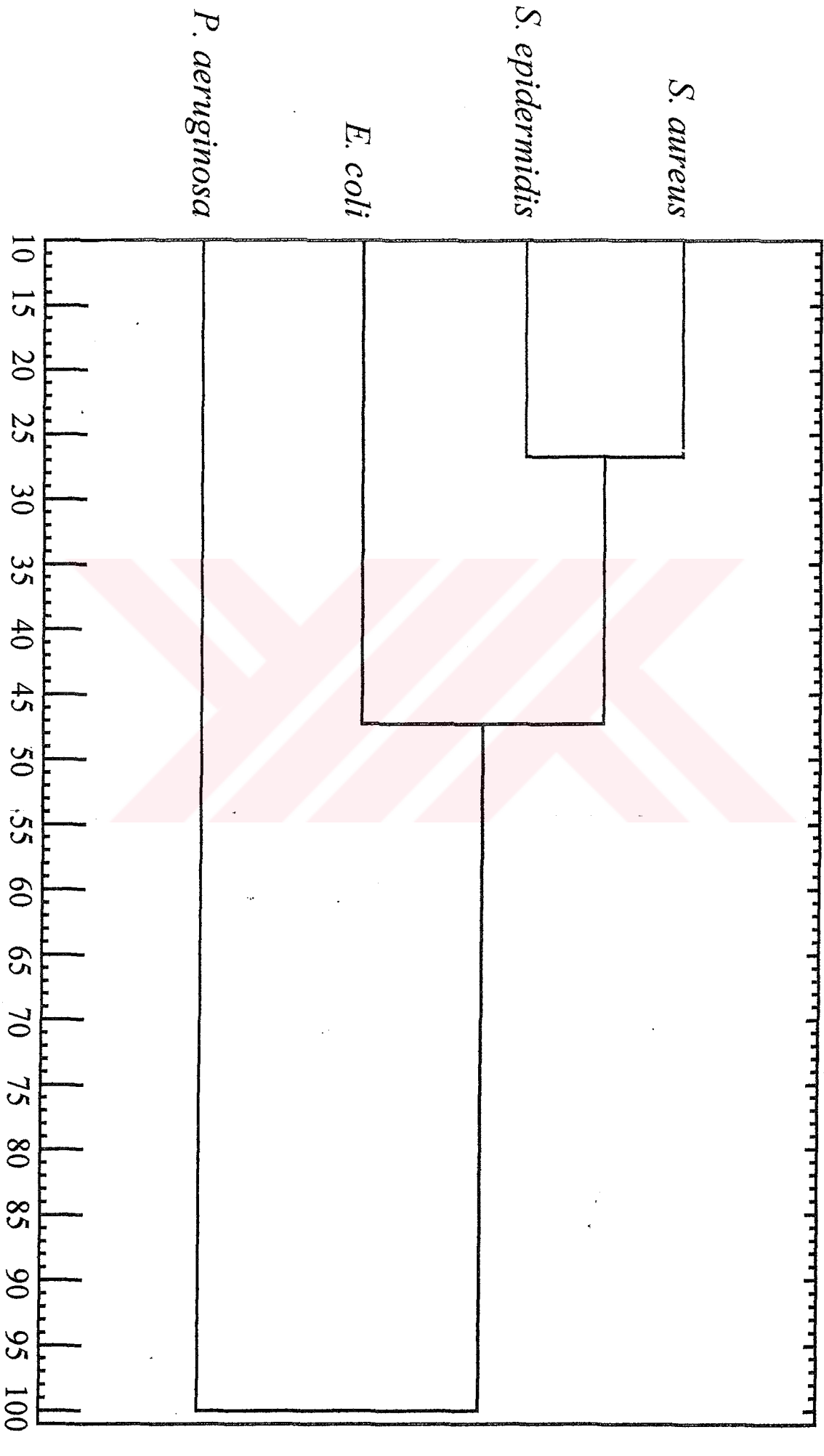
S.epidermidis suşlarının 24 saatlik enkübasyon süresi sonunda kontrol ve deney kuyucuklarından elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı veriler elde edilmezken ($p>0.05$), 48 saatlik enkübasyon sonucunda 25 µg/ml'lik EDDHA'lı kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri ile 100 µg/ml'lik EDDHA ihtiva eden kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri açısından istatistiksel olarak absorbans değerlerinin düşüşüne yönelik ($p<0.01$) anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 2).

E.coli bakterisinde ise diğer bakteri gruplarına benzer bir şekilde 24 saatlik enkübasyon döneminde kontrol ve diğer gruplar arasında EDDHA'nın üreme üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı ($p>0.05$); 48 saatlik enkübasyon süresi sonucunda ise 25 µg/ml EDDHA içeren ortamlardan elde edilen absorbans değerleri ile 100 µg/ml EDDHA içeren üreme ortamından elde edilen değerler arasında absorbans değerlerinin düşüş yönünde ($p<0.003$) istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir(Tablo 3).

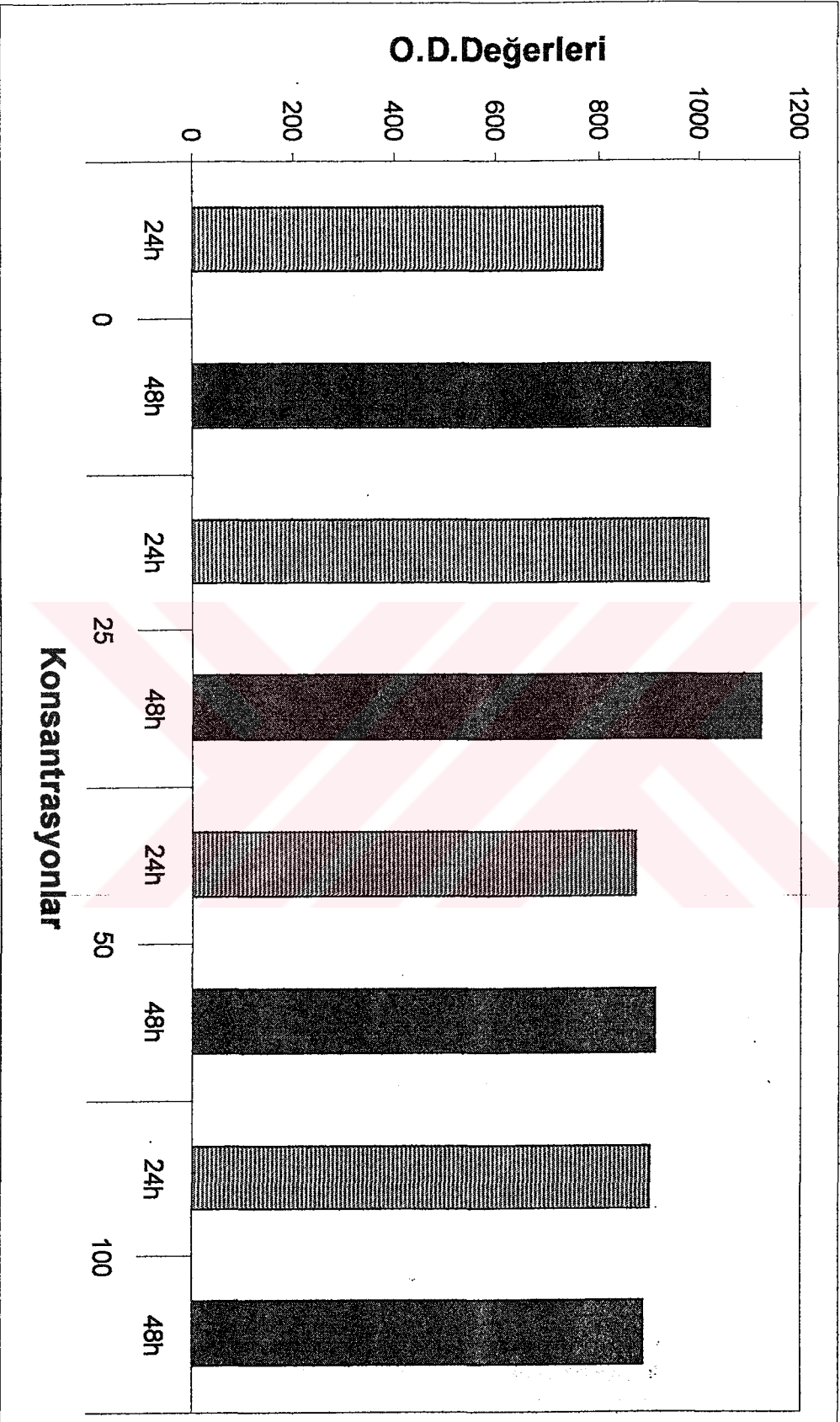
P.aeruginosa'nın üreme sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 24 saatlik enkübasyon sonucu kuyucuklardan elde edilen değerler arasında bir fark olmadığı, 48 saatlik enkübasyon sonucunda kontrol ile 100 µg/ml EDDHA ihtiva eden kuyucuklardan elde edilen değerler arasında ($p<0.03$), yine 25 µg/ml EDDHA ihtiva eden kuyucuktan elde edilen değerler ile 100 µg/ml EDDHA ihtiva eden kuyucuklardan elde edilen değerler arasında absorbans değerinin düşmesine yönelik istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0.003$). Yine 48 saatlik enkübasyon sonucunda 50 µg/ml EDDHA'lı kuyucuklardan elde edilen absorbans değerlerinin ise 100 µg/ml EDDHA ihtiva eden kuyucuklardan elde edilen değerlerde absorbans değerlerinin düşmesine yönelik ($p<0.002$) istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 4).

Çalıştığımız suşlarda 48 saatte 25µg/ml EDDHA'lı ortamda üremede artış olduğu, 50 µg/ml ve 100 µg/ml EDDHA'lı ortama doğru gidildikçe üremede azalmanın olduğu ve tüm suşlarda 25 µg/ml ile 100 µg/ml EDDHA'lı ortam arasındaki istatistik farklılığın bunu desteklediği gözlemlenmiştir.

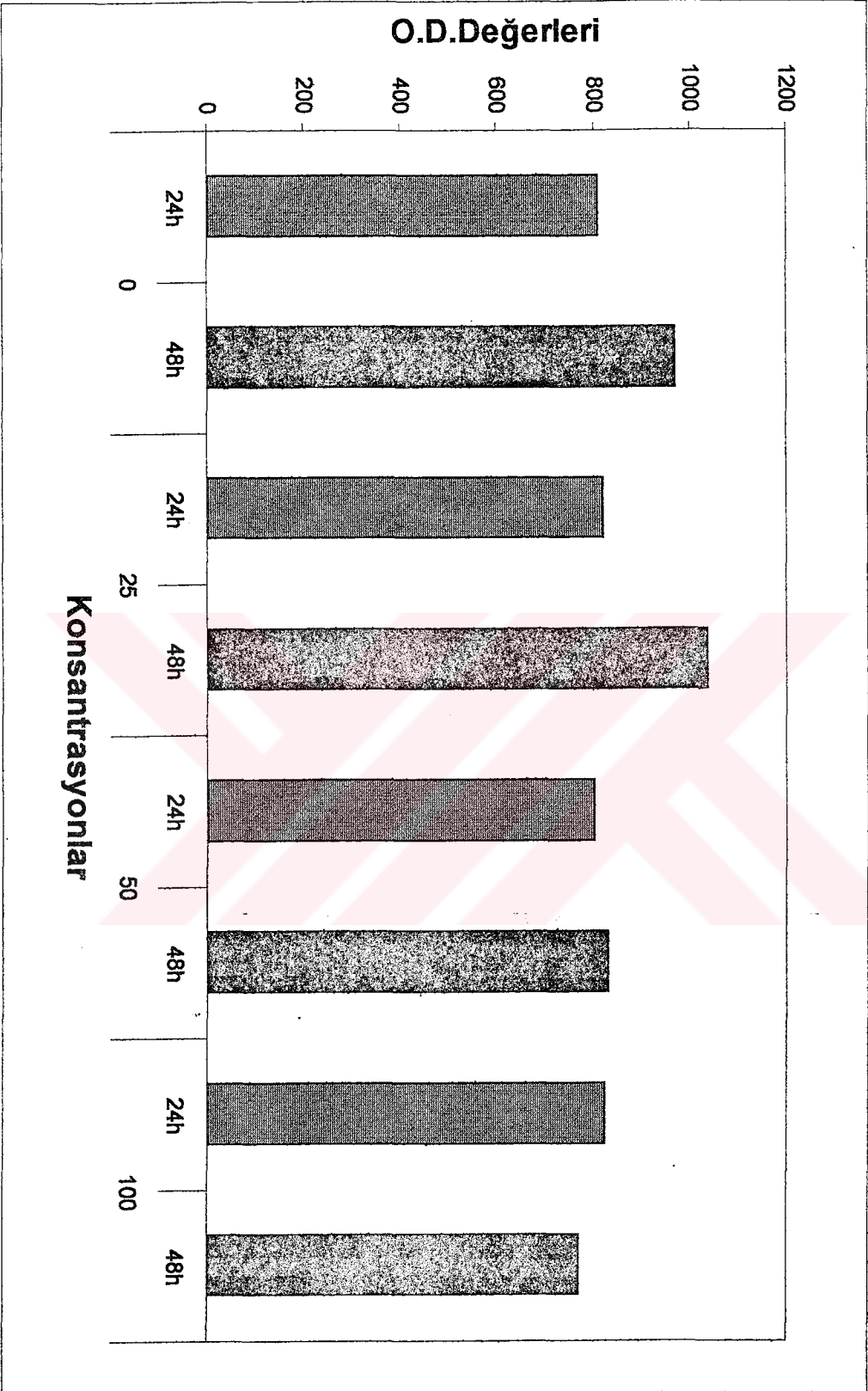
S. aureus, *S.epidermidis* ve *P.aeruginosa* suşları 25 µg/ml EDDHA'lı ortamda 24 ve 48 saat diliminde üreme hızları açısından anlamlı bir fark olmadığı, aynı durumun 50 µg/ml ve 100 µg/ml EDDHA'lı ortamın herbirinin 24 ve 48 saatlik zaman diliminde kendi aralarında istatistiki olarak üreme hızları açısından anlamlı sonuç olmadığı, sadece *E. coli*'nin 24 saatte 25 µg/ml EDDHA içeren kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri ile 48 saat enkübasyon döneminde aynı EDDHA konsantrasyonunda elde edilen absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar elde edildiği gözlenmiştir($p<0.01$).



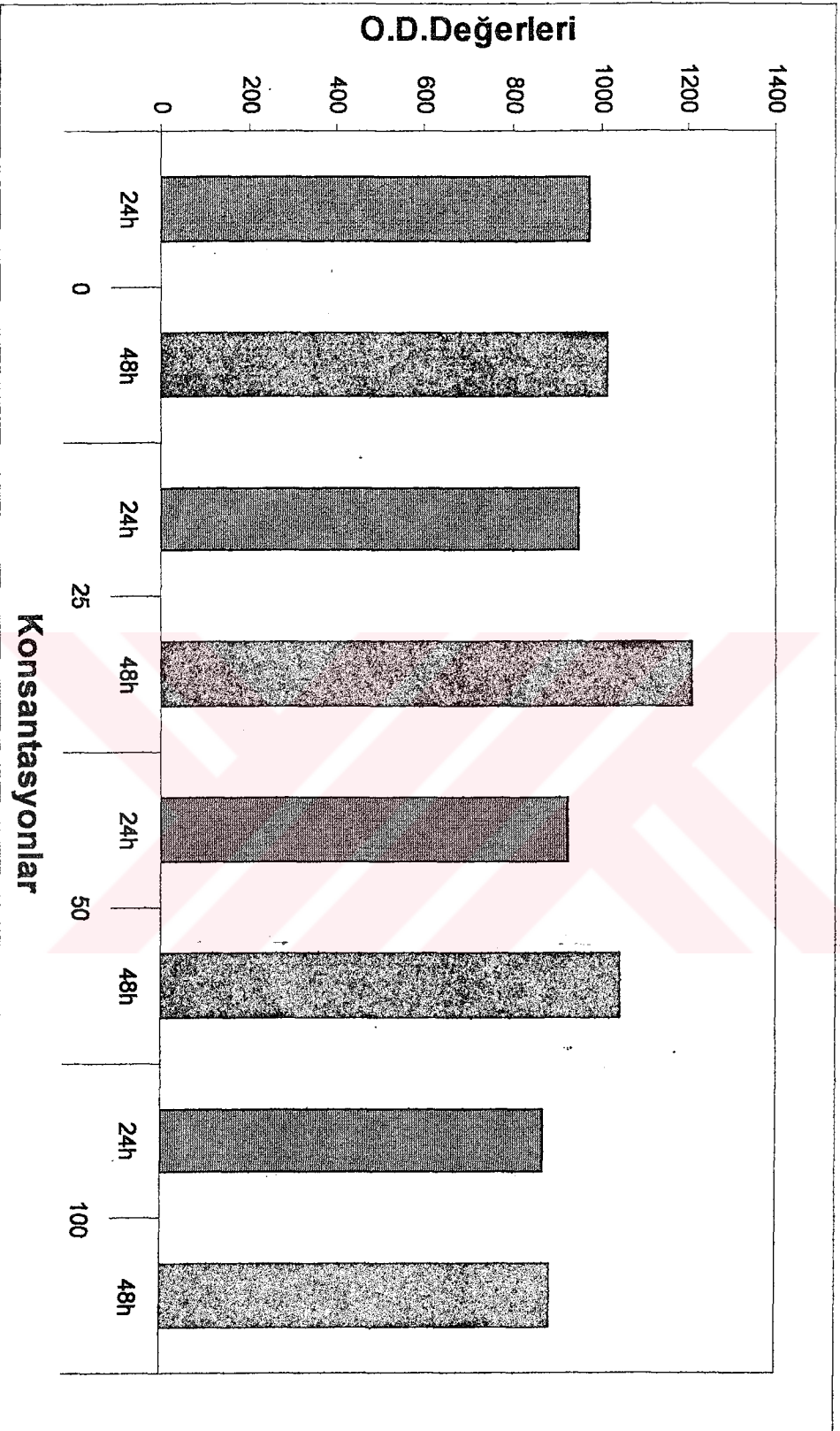
Şekil 1: EDDHA'lı ortamda konsantrasyon farkı gözlemeksizin *S. Aureus* *S. Epidermidis* *E. coli* *P. Aeruginosa* için üreme hızlarının absorbanans değerleri açısından karşılaştırılması



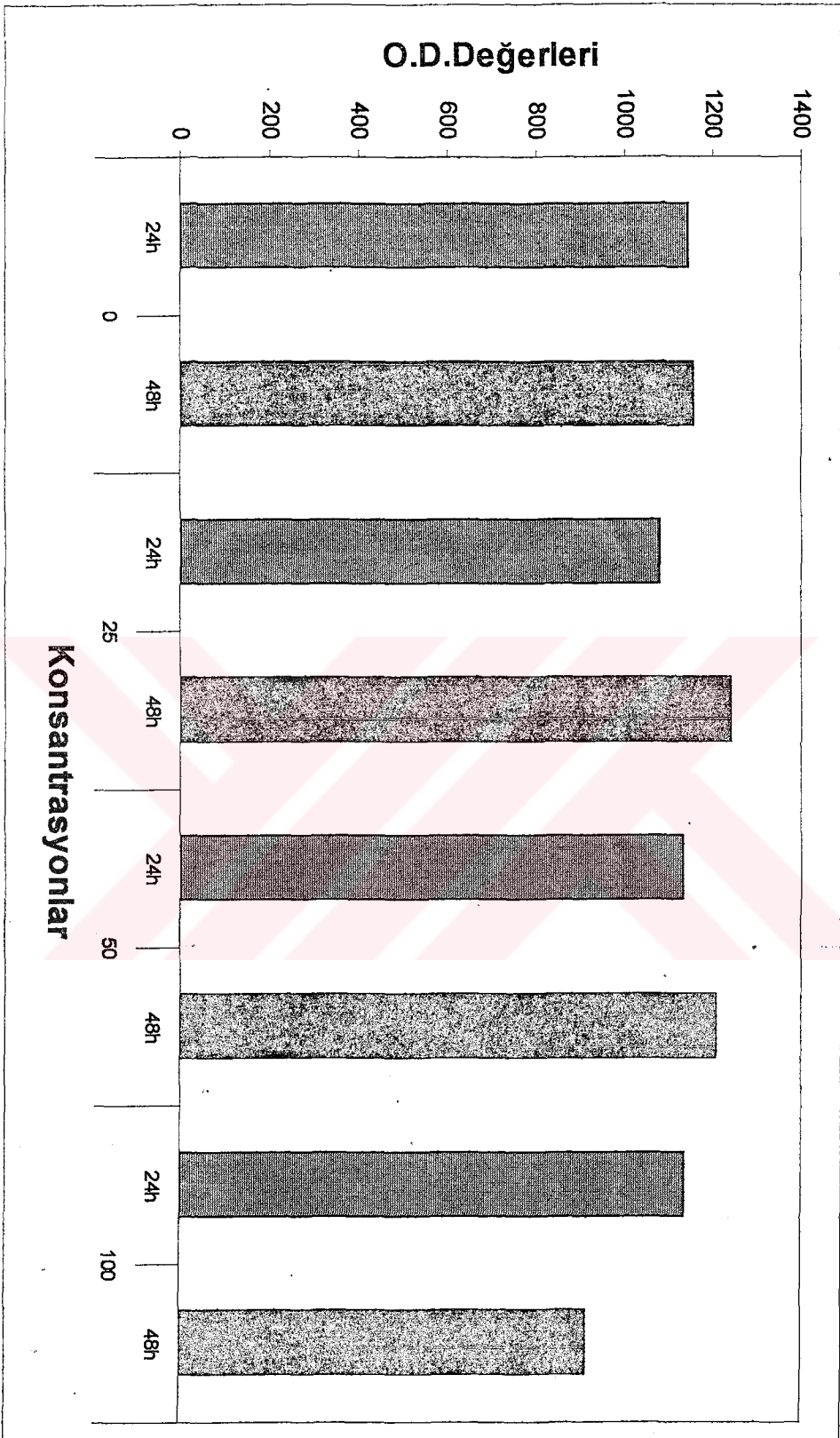
Tablo 1: Farklı konsantrasyonlarda EDDHA(0 µg /ml, 25 µg /ml, 50 µg /ml, 100 µg /ml) ilave edilmiş TSB'de *S.aureus*'un 24 ve 48 saatteki üreme hızları



Tablo 2: Farklı konsantrasyonlarda EDDHA(0 µg /ml, 25 µg /ml, 50 µg /ml, 100 µg /ml) ilave edilmiş TSB'de *S. epidermidis*'in 24 ve 48 saatteki üreme hızları



Tablo 3: Farklı konsantrasyonlarda EDDHA(0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml) ilave edilmiş TSB'de *E. coli*'nin 24 ve 48 saatteki üreme hızları



Tablo 4: Farklı konsantrasyonlarda EDDHA(0 µg /ml, 25 µg /ml, 50 µg /ml, 100 µg /ml) ilave edilmiş TSB'de *P. aeruginosa*'nın 24 ve 48 saatteki üreme hızları

TARTIŞMA

Demirin mikroorganizmaların enfeksiyon oluşturmada invazyonu artıran bir element olduğu çeşitli araştırmalarla desteklenmiştir. Patojen mikroorganizmalar vücutta serbest Fe^{+2} yokluğunda, bağlı demir'i transferrin'den, ferritin'den ve laktoferrin'den elde edebilmek için siderofor denen ve Fe^{+3} 'ü yüksek düzeyde bağlayan demir şelatörlerini sentezlerler. Bu olay sonucunda demir şelatörleri içerisinde reseptör görevi gören 70-90 kd ağırlığındaki dış membran proteinlerinin miktarında önemli bir artış görülür (11,9, 15).

İnsan serumu çeşitli patojen bakterilerin üremesini inhibe eden faktörlere sahiptir. Serumda majör demir bağlayıcı protein olan transferrin, bakterilerin üremesi için gerekli serbest demiri bağlayarak bakteristatik etki gösterir. Baltimore ve arkadaşları (6); serumda % 25-30 doymuş transferrin'i daha fazla doymuş hale getirmek için yeterli iyonik demir ilave ettiklerinde, transferrin doymuşluğunun artmasıyla, ortamda serbest demir artmış ve transferrin'in bakteristatik etkisinin ortadan kalktığını gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacılar invitro sistemde yüksek doymuş transferrin'li serumun (Fe^{+3} 'le yeterli şekilde doymuş transferrin) serbest demiri bağlayamamasından ve ortamda serbest demir miktarının artmasından dolayı hızlı bakteriyel büyüme meydana geldiğini gözlemlemişlerdir.

Holbein ve arkadaşları (9); 2 grup fare üzerinde yaptıkları deneyde, 1. grup fareye 22,7 μg Fe^{+3} taşıyan 17,5 mg transferrin vermişlerdir. 2. grup kontrol grubu fareye izotonik tuz solusyonu verilmiştir. Daha sonra her iki grup farede deneysel olarak *N.meningitidis* ile enfekte edilmiştir. Çalışma sonucunda 1. grup farede enjekte edilen transferrin'e bağlı Fe^{+3} 'in, *N.meningitidis* enfeksiyonu gelişimini kolaylaştırırken, kontrol grubunda beklenen derecede bakterilerin organ tutma ve sepsis gelişimi olmadığı, böylece çalışmada *N.meningitidis*'in invivo olarak çoğalmasında Fe^{+2} 'in önemi vurgulanmıştır.

Payne ve arkadaşları (3); organizmada bakterilerin üremesi için demirin rolünü amaçlayan çalışmalarında, 2 grup fare oluşturarak, 1. grup fareleri Fe^{+2} -eksik diyetle, 2. grup

fareleri ise normal diyetle beslemişlerdir. 1. ve 2. grup fareler *S.typhimurium*'la enfekte edildiklerinde, 1. grup farelerin *S.typhimurium* enfeksiyonuna 2. grup farelerden daha az duyarlı oldukları görülmüştür. Aynı araştırmacılar yine farklı bir incelemede, demir kazanımında demir bağlayıcı ajan olan sideroforun hayvansal deneylerde *Salmonella* ve *E.coli*'nin virulansını arttırdığını gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Rabsch ve arkadaşları (16); *S.typhimurium* türlerinin transferrin'i kullanabilme yeteneklerini araştırmışlardır. Demirin sınırlandırıldığı nutrient broth'ta bakterilerin Fe^{+3} -transferrin'i kullanabilmeleri yönünden incelediklerinde erken log fazında türlerin büyümeleri için gerekli Fe^{+3} 'ü yakalayabilme yeteneğinde oldukları görülmüştür. Bu araştırmacılar dört *S.typhimurium* türünün transferrin'den Fe^{+3} kazanımının erken log fazının, geç log fazına göre daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir.

Pettersson ve arkadaşları (15); demirin üreme ortamındaki miktarının sınırlandırılmasına *Neisseria*'ların diğer patojen mikroorganizmalardan farklı olarak siderofor sentez edemediğini, demiri serumdaki transferrin'den veya mukozal yüzeylerdeki laktoferrin'den direkt olarak elde etme yeteneğinde olduğunu tespit etmişlerdir.

Yine demirin sınırlandırılmasıyla ilgili bir araştırmada ortamlarda *C.jejuni* bakterisinin üreme hızı ölçülmüş, düşük demir konsantrasyonunun olduğu ortamda bakterinin büyüme hızlarının düşmesinin yanı sıra üreyen mikroorganizmaların değişik morfolojik şekiller aldığı belirlenmiştir. Deneyde kullanılan 26 *C.jejuni* türünün 7'sinin yüksek düzeyde demir bağlayıcı sideroforlar meydana getirdiği tespit edilmiştir(17).

Calver ve arkadaşları (4); demir bağlayıcı başka bir madde olan desferal'in (Fe^{+2} bağlayıcı kemoterapötik) üreme ortamına katılarak demirin sınırlandırıldığı çalışmada *N.meningitidis* ve diğer apatojen *Neisseria* grubu bakterilerin üreme hızlarının yavaşladığı gözlemlenmiştir. Ferritin'in invivo şartlarda demiri depolayarak hücrel demir bağlayıcı görevi olduğu bilinmektedir. Invitro bir çalışmada hücrel demir bağlayıcı protein olan ferritin üreme ortamına eklenmiş, daha sonra ortama tekrar demir ilavesi yapılmıştır.Besiyerindeki Fe^{+2}

konsantrasyonu arttırıldıkça ferritin'in demiri bağlayarak doygun hale geçmesi sağlanmış ve her aşamada deneyde kullanılan bakterilerin üreme hızları belirlenmiştir . İlk etapta ferritin Fe^{+3} 'i bağlayarak mikroorganizmalar üzerinde üremelerini baskılayıcı etkisi belirlenmiş, daha sonra ortamdaki serbest demir miktarının artmasıyla mikroorganizmaların üreme hızlarının arttığı görülmüştür. Çalışmada *N.meningitidis*'in azaltılmış ferritin varlığında üremesi için mevcut Fe^{+3} 'den yararlanabilme kapasitesi ile enfeksiyon oluşturabilme kabiliyeti arasında ilişki gösterilmiş, deney sonucunda meningokokal enfeksiyonların engellenmesinde ferritin'in rolü tespit edilmiştir.

Desferal'in yine demir bağlayıcı olarak kullanıldığı farklı bir çalışmada *Neisseria* türlerinin Fe^{+2} bileşiklerini kullanabilme ve Fe^{+3} bağlayan proteinlerden demir koparabilme yetenekleri incelendiğinde, üreme ortamına desferoxamin (Fe^{+2} bağlayıcı kemoterapötik) ve ısıtılmış insan serumu eklemişlerdir. Desferoxamin ile üreme ortamında serumda bulunan serbest demir bağlanmış, serumda demir proteinlere bağlı olarak kalmıştır. Desferoxamin ile serbest demirin bağlanmasıyla üreme ortamında serum içerisinde proteinlere bağlı olarak bulunan Fe^{+3} 'i mikroorganizmaların kullanabilme yetenekleri incelendiğinde, pnömokokların, meningokokların ve bazı kommensal *Neisseria* türlerinin büyümelerinin arttığı gözlemlenmiştir (13).

Khashe ve arkadaşları (14); 71 *Citrobacter* türünü biyolojik ve kimyasal ölçümlerle demir kazanabilme mekanizmaları açısından incelemişler ve besiyerine eklenen EDDHA konsantrasyonu 250 $\mu\text{g/ml}$ ile 1000 $\mu\text{g/ml}$ arada değiştiğinde *Citrobacter* türlerinde üreme sınırlanması olduğu gözlemlenmiştir. EDDHA ile demir sınırlanması yaratılan besiyerinde *C.koseri*'nin ürediği, *C.koseri*'nin besiyerinde EDDHA'ya bağlanan Fe^{+2} 'i kullanarak ürediğini gözlemlemişlerdir. Bu mikroorganizmalar bağlı Fe^{+2} 'i kullanarak sideroforlar için reseptör görevi yapan yüksek moleküllü kitle proteinlerinde değişiklikler yaratmışlardır. *C.koseri*'nin demir sınırlanması olan ortamlarda meydana getirdiği yüksek moleküllü kitle proteinlerindeki değişiklikler, bağırsak enfeksiyonu yapan *C.koseri*'nin bağırsak dışı enfeksiyon oluşturmada virulansla ilişkili mekanizmayı desteklemektedir.

Neelam ve arkadaşları (11); EDDHA, Dipy ve 8 – Hydroxyquinoline (8 HQ)'u besiyerine katıp demir sınırlandırması yaratarak *Aeromonas salmonicida* için üreme durumunu incelemişlerdir. EDDHA ile demir sınırlandırması yaratılan besiyerinde *Aeromonas salmonicida*'nın üremesinde kısmi bir azalma olduğu, fakat Dipy ve 8HQ'nun EDDHA'ya göre daha fazla demir sınırlandırması yaratarak, *Aeromonas salmonicida*'nın üremesinde %50-%90 üremeyi azalttığı gözlemlenmiştir.

Herrington ve arkadaşları (10); *H.influenzae*'nin hem dışında, demir kaynağı olarak transferrin laktoferrin'i kullanıp kullanmadıklarını araştırmak amacıyla serumdaki laktoferrin ve transferrin dışındaki Fe^{+2} 'leri bağlayabilmek için besiyerine EDDHA eklemişlerdir. Besiyerinde serumdaki öteki Fe^{+2} kaynaklarını bağladıklarında *H.influenzae*'nin bu besiyerinde ürettiği ve demir kaynağı olarak da transferrinden yararlandıklarını gözlemlemişlerdir. Ayrıca *H.influenzae* tip b'de demirin bağlandığı ortamlarda 94.000 – 98.000 daltonluk dış membran protein miktarının artmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile *H.influenzae*'nin demir kaynağı olarak transferrin ve laktoferrin'i kullanma yeteneğinin yanı sıra demir eksikliğinde dış membran oluşturan proteinlerde bir artma olduğu tespit edilmiştir.

Tüm bu araştırmalar bakterilerin üreme ve metabolizmalarında, bir makro element olan Fe^{+2} 'e olan ihtiyacı ve mevcut demirin nasıl kullanıldığını gösteren çalışmalardır. Bu çalışmalarda mikroorganizmaların serbest demiri elde etme becerisinin yanında, demir miktarının bakteri üremeleri temel olmak üzere virulanslarını da etkileyen önemli bir faktör olduğunu göstermiştir. Özellikle bakterilerin değişik log fazlarında bölünme zamanları üzerine Fe^{+2} etkisi belirgindir.

Sonuçlarımızı tüm bu çalışmalar ışığında yorumlarsak; kullandığımız bakterilerin invitro olarak demir sınırlandırılmasına karşı üreme absorbans değerlerinin karşılaştırılmasında *S.aureus* ve *S.epidermidis*'in benzerlik gösterdiği (% 74 oranında) her iki bakterinin hem 24 hem de 48 saatlik enkübasyon dönemlerinde özellikle 25 µg/ml EDDHA'lı ortamlarda üreme absorbans değerlerinin yükseldiği, fakat buna karşılık her iki bakteri içinde enkübasyon süresi ve EDDHA

miktarı arttıkça üremenin yavaşladığı, özellikle 25 µg/ml EDDHA konsantrasyonlarındaki absorbans değerleri açısından 48 saatlik enkübasyonlarda istatistiksel olarak absorbans değerlerinin düştüğü görülmüştür. Bakterilerin üremeleri esnasında Fe^{+2} ihtiyacı, 25 µg/ml EDDHA ile demir sınırlandırılması yaratılan TSB besiyerinin *S.aureus*, *S.epidermidis* ve *E.coli* için optimal demir miktarı olduğu görülmektedir.

Çalışmada kullanılan *E.coli* suşlarından alınan absorbans değerlerinde hem EDDHA miktarı hem de enkübasyon süresi de gözönüne alındığında *S.aureus* ve *S.epidermidis* ile (% 53 oranında) benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

P.aeruginosa'ın ise bu üç bakteriden farklı olarak 24 saatlik enkübasyon süresince farklı demir sınırlandırılmasına istatistiki olarak anlamlı sonuçlar vermezken, 48 saatlik enkübasyonda 25 µg/ml EDDHA'lı ortamda üreme absorbans değerlerinin yükseldiği fakat bu konsantrasyondan sonra EDDHA miktarına paralel olarak üremenin yavaşladığı tespit edilmiştir.

Sonuç itibariyle 25 µg/ml EDDHA ile sınırlandırılan ortamın çalışılan tüm bakteriler için ve demir konsantrasyonu açısından optimal değerler olduğu görülmektedir. Bu anlamda bakterilerin üreme dönemleri antibiyotik duyarlılık testleri, metabolik faaliyetleri ve ürünleri gibi çalışmalarda invitro üreme ortamlarında pH, üreme ısısı gibi koşulların yanı sıra makro ve mikro elementlerin standardizasyonun da önemli olduğu görülmektedir.

SONUÇ

- ❖ *S.aureus* ve *S.epidermidis*'in invitro olarak demir sınırlandırılmasına karşı üreme absorbans değerlerinin % 74 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür. Her iki bakteri için 25µg/ml EDDHA'lı ortamda 24 ve 48 saatlik enkübasyon döneminde üreme hızlarının yükseldiği izlenirken, 25 µg/ml EDDHA'lı ortamın diğer EDDHA'lı ortamlarla (50 µg/ml, 100 µg/ml) karşılaştırıldığında 24 saatlik enkübasyon açısından bir fark olmadığı fakat 48 saatlik enkübasyon açısından üreme değerlerinde düşme olduğu gözlenmiştir.
- ❖ Sonuç olarak *S.aureus* ve *S.epidermidis* için üreme absorbans değerleri gözönüne alındığında TSB besiyerinin 25 µg/ml EDDHA ile demir sınırlanması, bu iki bakteri için optimal demir miktarı olduğunu göstermektedir.
- ❖ *E.coli* suşlarının üreme değerlerinde *S.aureus* ve *S.epidermidis* ile % 53 oranında benzerlik görülmektedir. 25 µg/ml EDDHA kullanılarak demir sınırlanması yaratılan besiyerinde kontrol grubuna göre, 24 saatlik enkübasyonda bir değişiklik görülmezken, 48 saatlik enkübasyonda üreme değerlerinde artış görülmüştür. 25 µg/ml EDDHA'lı ortamın, 50 µg/ml ve 100 µg/ml EDDHA'lı ortamlarla üreme absorbans değerlerinde yapılan kıyaslamada 24 saatlik enkübasyonda ortamlar arasında bir fark görülmezken, 48 saatlik enkübasyonda 50 µg/ml ve 100 µg/ml EDDHA'lı ortamda üreme değerleri açısından düşme olduğu saptanmıştır.
- ❖ *P.aeruginosa* için üreme absorbans değerleri açısından incelendiğinde, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml EDDHA'lı besiyerinde 24 saatlik enkübasyon açısından anlamlı bir fark görülmezken, 48 saatlik enkübasyon açısından ise 25 µg/ml'ye göre 50 µg/ml ve 100 µg/ml de üreme oranlarında düşme görülmüştür.

ÖZET

Çalışmamızın bu kısmında değişik kliniklerden gelen materyallerden izole edilen *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli* ve *P.aeruginosa* bakterilerinin değişik oranlarda (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml) EDDHA katılmış besiyerinde, 24 ve 48 saatlik enkübasyon döneminde demir kısıtlanmasının üremeleri üzerine etkileri incelendi.

S.aureus ve *S.epidermidis*'in invitro olarak üreme absorbands değerleri açısından % 74 oranında benzerlik gösterdiği, 25 µg/ml EDDHA'lı ortamda 24 ve 48 saatlik enkübasyonda üreme hızının yükseldiği fakat 50 µg/ml ve 100 µg/ml EDDHA'lı ortamda 48 saatlik enkübasyonda üreme absorbands değerlerinin düştüğü görülmüştür.

E.coli suşlarının 25 µg/ml EDDHA kullanılan besiyerinin 48 saatlik enkübasyon döneminde üreme oranlarında artış görülürken 50 µg/ml ve 100 µg/ml EDDHA'lı ortamın 48 saatlik enkübasyon döneminde üreme hızlarında düşme görülmüştür.

P.aeruginosa suşlarının 50 µg/ml ve 100 µg/ml EDDHA'lı ortamın 25 µg/ml EDDHA'lı ortama göre 48 saatlik enkübasyon döneminde üreme oranlarında düşme olduğu gözlemlendi.

SUMMARY

In this part of our study *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* isolated from the materials that were sent by different clinics, were evaluated in the medium containing EDDHA at different concentration (0 concentration, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml), in order to evaluate the effects caused by reducing the concentration of iron on the growth at the incubation period that took 24-48 hours. The absorbance value of growth was evaluated. In vitro, the growth absorbance value of *S. aureus* and *S. epidermidis* showed similarities about % 74, the growth absorbance value at 24-48 hours incubation period containing 25 µg/ml EDDHA was increased whereas, the growth absorbance value at 48 hours incubation containing 50 µg/ml and 100 µg/ml was decreased.

The growth absorbance value of *E. coli* strains at 48 hours incubation period using a medium containing 25 µg/ml EDDHA was increased, its growth absorbance value at 48 hours incubation period using medium containing 50 µg/ml and 100 µg/ml EDDHA was decreased.

At the 48 hours incubation period of *P. aeruginosa* strains, the value was decreased using medium containing 50 µg/ml and 100 µg/ml EDDHA rather than using a medium containing 25 µg/ml EDDHA.

KAYNAKLAR

- 1- Guyton CA. Tıbbi Fizyoloji: Demir metabolizması. İstanbul: Yüce Yayın, 1996: 430-431.
- 2- Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji: Vitamin ve Minerallerin Emilimi. 20. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, 2002: 462-463
- 3- Payne SM, Finkelstein RA. The critical role of Iron in Host – Bacterial Interactions , Infection and Immunity, 1978 ; 61: 1428 – 1440 .
- 4- Calver GA, Kenny CP, Kushner DJ. Inhibition of the growth of *Neisseria meningitidis* by reduced Ferritin and other iron – binding agents , Infection and Immunity, 1979 ; 25 : 880 – 890 .
- 5- Pidcock KA, Wooten JA, Daley BA, Stull TL. Iron acquisition by *Haemophilus influenzae*, Infection and Immunity, 1988 ; 56 : 721 – 725 .
- 6- Baltimore RS, Shedd DG, Pearson HA. Effect of iron saturation on the bacteriostasis of human serum : invivo does not correlate with invitro saturation ,The Journal of pediatrics, 1982 ; 101 : 519 – 523 .
- 7- Salyers AA, Whitt DD. Bacterial Pathogenesis : Iron Acquisition Mechanisms. Washington : American Society for Microbiology, 1994: 39-40
- 8- Hunolstein CV, Ricci ML, Valenti P, Orefici G. Lack of activity of transferrins towards *Streptococcus* spp , Med Microbiol Immunol, 1992 ; 181 : 351 – 357 .
- 9- Holbein BE. Enhancement of *Neisseria meningitis* infection in Mice by addition of iron bound to Transferrin, Infection and Immunity, 1981 ; 34 : 120 – 125 .
- 10- Herrington DA, Sparling PF. *Haemophilus influenzae* can use Human Transferrin as a sole source for required iron, Infection and Immunity, 1985 ; 48 : 248 – 251 .
- 11- Neelam B, Robinson RA, Price NC, Stevens L. The effect of iron limitation on the growth of *Aeromonas salmonicida*, Microbios, 1993 ; 74 : 59 – 67 .

- 12-Kvach JT, Wiles TI, Mellencamp MW, Kochan I. Use of Transferrin – Iron – Enterobactin complexes as the source of Iron by serum – Exposed Bacteria, Infection and Immunity 1977 ; 18 : 439 – 445 .
- 13-Mickelsen PA, Sparling PF. Ability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and commensal *Neisseria* species to obtain iron from Transferrin and iron compounds, Infection and Immunity, 1981 ; 33 : 555 – 564 .
- 14-Khashe S, Janda JM. Iron utilization studies in *Citrobacter* species, FEMS Microbiology Letters, 1996 ; 137 : 141 – 146 .
- 15-Pettersson A , Poolman JT , Ley PV , Tommassen J . Response of *Neisseria meningitidis* to iron limitation, Microbiol, 1997 ; 71 : 129 –136 .
- 16-Rabsch W, Reissbrodt R.. Eisenaufnahme durch *Salmonella typhimurium* – Stamme unterschiedlicher epidemiologischer Herkunft, J . Basic Microbiol, 1985 ; 25 : 119 – 126.
- 17-Field LH, Headley VL, Payne SM, Berry LJ. Influence of Iron on Growth , Morfology, Outer membrane protein composition, and synthesis of siderophores in *Campylobacter jejuni*, Infection and Immunity, 1986 ; 54 : 126 – 132 .
- 18-Mellencamp MW, McCabe MA, Kochan I. The growth – promoting effect of bacterial iron for serum – exposed bacteria , Immunology, 1981 ; 43.: 483 – 491 .
- 19-Sao MS, Sanders GH, Grisham JW. Regulation of Growth of cultured Hepatic Epithelial cells by Transferrin, Experimental cell Research, 1987 ; 171 : 52 – 62 .
- 20-Worsham PL, Konisky J. Effect of Growth temperature on the Acquisition of Iron by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* , Journal of Bacteriology, 1984 ; 158 : 163 –168.
- 21-Kang HY, Brickman TJ, Beaumont FC, Armstrong SK. Identification and characterization of iron-regulated *Bordetella pertussis* alcaligin siderophore biosynthesis genes, Journal of Bacteriology, 1996; 178: 4877-4884.

- 22-Park SF, Richardson PT. Molecular characterization of a *Campylobacter jejuni* lipoprotein with homology to periplasmic siderophore-binding proteins, *Journal of Bacteriology*, 1995; 177: 2259-2264.
- 23-Moore CH, Foster LA, Gerbig DG, Dyer DW, Gibson BW. Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*, *Journal of Bacteriology*, 1995; 177: 1116-1118.
- 24-Angerer A, Klupp B, Braun V. Iron transport systems of *Serratia marcescens*, *Journal of Bacteriology*, 1992; 174: 1378-1387.
- 25-Howard SP, Herrmann C, Stratilo CW, Braun V. In Vivo Synthesis of the Periplasmic Domain of TonB Inhibits Transport through the FecA and FhuA Iron Siderophore Transporters of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 2001; 183: 5885-5895.
- 26-Pradel E, Locht C. Expression of the Putative Siderophore Receptor Gene *bfrZ* Is Controlled by the Extracytoplasmic-Function Sigma Factor *BupI* in *Bordetella bronchiseptica*, *Journal of Bacteriology*, 2001; 183: 2910-2917.
- 27-Bäumler AJ, Norris TL, Lasco T, Voigt W, Reissbrodt R, Rabsch W, Heffron F. *IroN*, a Novel Outer Membrane Siderophore Receptor Characteristic of *Salmonella enterica*, *Journal of Bacteriology*, 1998; 180: 1446-1453.
- 28-Kang HY, Armstrong SK. Transcriptional Analysis of the *Bordetella* Alcaligin Siderophore Biosynthesis Operon, *Journal of Bacteriology*, 1998; 180: 855-861.
- 29-Pradel E, Guiso N, Locht C. Identification of *AlcR*, an AraC-Type Regulator of Alcaligin Siderophore Synthesis in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*, *Journal of Bacteriology*, 1998; 180: 871-880.
- 30-Hassett DJ, Sokol PA, Howell ML, Ma JF, Schweizer HT, Ochsner U, Vasil ML. Ferric uptake regulator (*Fur*) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities, *Journal of Bacteriology*, 1996; 178: 3996-4003.

- 31-Kuhn S, Braun V, Koster W. Ferric rhizoferrin uptake into *Morganella morganii*: characterization of genes involved in the uptake of a polyhydroxycarboxylate siderophore, *Journal of Bacteriology*, 1996; 178: 496-504.
- 32-Kadner RJ, Heller KJ. Mutual inhibition of cobalamin and siderophore uptake systems suggests their competition for TonB function, *Journal of Bacteriology*, 1995; 177: 4829-4835.
- 33-Fetherston JD, Lillard JW, Perry RD. Analysis of the pesticin receptor from *Yersinia pestis*: role in iron- deficient growth and possible regulation by its siderophore, *Journal of Bacteriology*, 1995; 177: 1824-1833.
- 34-Prince RW, Cox CD, Vasil ML. Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa* fur gene, *Journal of Bacteriology*, 1993; 175: 2589-2598.
- 35-Brickman TJ, Armstrong SK. Alcaligin Siderophore Production by *Bordetella bronchiseptica* Strain RB50 Is Not Repressed by the BvgAS Virulence Control System, *Journal of Bacteriology*, 2002; 184: 7055-7057.
- 36-Qian Y, Lee JH, Holmes RK. Identification of a DtxR-Regulated Operon That Is Essential for Siderophore-Dependent Iron Uptake in *Corynebacterium diphtheriae*, *Journal of Bacteriology*, 2002; 184: 4846-4856.
- 37-Higgs PI, Letain TE, Merriam KK, Burke NS, Park H, Kang C, Postle K. TonB Interacts with Nonreceptor Proteins in the Outer Membrane of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 2002; 184: 1640-1648.
- 38-Carson SDB, Klebba PE, Newton SMC, Sparling PF. Ferric Enterobactin Binding and Utilization by *Neisseria gonorrhoeae*, *Journal of Bacteriology*, 1999; 181: 2895-2901.
- 39-Pelludat C, Rakin A, Jacobi A, Schubert S, Heesemann J. The Yersiniabactin Biosynthetic Gene Cluster of *Yersinia enterocolitica*: Organization and Siderophore-Dependent Regulation, *Journal of Bacteriology*, 1998; 180: 538-546.

- 40-Reissbrodt R, Kingsley R, Rabsch W, Beer W, Roberts M, Williams PH. Iron-regulated excretion of alpha-keto acids by *Salmonella typhimurium*, Journal of Bacteriology, 1997; 179: 4538-4544.
- 41-Ochsner UA, Vasil AI, Vasil ML. Role of the ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters, Journal of Bacteriology, 1995; 177: 7194-7201.



BÖLÜM II

İÇİNDEKİLER

Giriş	28
Genel Bilgiler	29
Materyal ve Metod	31
Bulgular	33
Tartışma	39
Sonuç	44
Özet	46
Summary	48
Kaynaklar	49

GİRİŞ

Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını ölçen antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçları dünyanın bir çok bölgesinden değişik araçlarla (makale bildiri v.b.) bildirilmekte ve veriler birbirleriyle karşılaştırılmaktadır.

Aynı cins bakteri ve antibiyotiklerden, farklı bölgelerden elde edilen sonuçlar arasındaki değişik oranlar, farklı bölgelerde izole edilen aynı tür bakteri populasyonları arasındaki fenotip ve genotip yapı farklılıkları, antibiyotik kullanım sıklığı ile antibiyotik duyarlılık testlerinin yapıldığı laboratuvarların optimal deney koşullarına bağlılıklarına göre değiştiği genel bir kanıdır. Optimal deney koşullarından kast edilen antibiyotik duyarlılığına bakılacak olan bakterinin deney tüpü içerisindeki yoğunluğu (cfu/ ml), besi yerinin pH'sı, besi yerinin kalınlığı, ayrıca deneysel olarak kullanılacak olan antibiyotiklerin miktarlarının standardizasyonu gibi özelliklerdir. Bunlar Amerika Birleşik Devletleri'ndeki, klinik laboratuvar standartlarını belirleyen uluslararası komite (NCCLS , National Committee For Clinical laboratory Standards) ve Avrupa antimikrobial duyarlılık testleri komitesi (EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) tarafından belirlenen kriterlerdir(1,2). Tüm klinik laboratuvarların bu kriterlere uyması zorunludur.

Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının invitro ölçülmesinde kullanılan besiyerlerinin temel maddesi kuru (dehidrate) haldeki maddelerdir. Bu kuru maddeler içerisindeki inorganik mikro (Zn^{+2} , Mn^{+2} v.b) ve makro (Na^{+1} , K^{+1} , Cl^{-1} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} v.b) maddelerin miktarlarının farklılıkları antibiyotiklerin etki mekanizmalarını etkilediği gibi farklı ortamlarda üretilen aynı tür mikroorganizmaların antibiyotiklerle olan duyarlılık sonuçlarının farklılaşmasına neden olduğu araştırmacılar tarafından belirlenmiştir(3,4,5,6).

Bu amaçla çalışmada demir miktarını sınırladığımız Mueller-Hinton agar besiyerinde, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli* ve *P.aeruginosa* gibi bakterilerin bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Demir bakterinin üremesi için temel maddelerden biridir. Özellikle *invivo* ortamdaki serbest demir miktarının fazlalığı bakteri üremesini stimule edebildiği gibi bakterinin virulansını da artıran bir özelliktir(7,8,9).

Invitro olarak üretilen *E.coli*, *S. typhimurium*, *C. jejuni* gibi bakterilerin elektroforez yöntemi ile dış membran proteinleri belirlendikten sonra, bu ekstra dış membran proteinlerin bakterinin antibiyotiklerle olan ilişkilerindeki görevleri bir başka araştırma konusu olduğu sonucuna varılmıştır(10).

Bakteriler *invitro* olarak üretildikleri besiyerleri içerisindeki elementlerin miktarlarının oldukça farklılık gösterdiği birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir. Örneğin BBL ve Difco firmalarının ürettikleri MHA besiyerlerinde kalsiyum, demir, magnezyum ve çinko değerlerini ölçen bir araştırmada BBL Mueller-Hinton Agarda kalsiyumu 21.50 µg/ml demiri 1.17 µg/ml, mangani 11.86 µg/ml, çinkoyu 2.61 µg/ml bulurken, Difco Mueller-Hinton agarda kalsiyumu 19.50 µg/ml demiri 1.05 µg/ml, mangani 10.48 µg/ml, çinkoyu ise 0.17 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. İki farklı şirketin aynı tür besiyeri içerisindeki çinko miktarları arasındaki fark dikkat çekicidir(3).

Bakterilerin antibiyotiklerle olan ilişkilerinde, ortamdaki Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi elementlerin miktarlarının da farklılığı hassasiyet testleri üzerinde etkilidir. Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının bir denge içerisinde olması gerekirken, aminoglikozit grubu antibiyotiklerin bakteriler üzerine etkisinde Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyon dengesinin bir uyum içerisinde olmaması duyarlılık testlerini etkileyen önemli faktörlerdendir (11).

Yine karbapenem grubu antibiyotiklerin özellikle *P.aeruginosa* bakterilerine karşı duyarlılıklarında ortamdaki çinko miktarı ile bağlantılı olduğu görülmüştür. Yüksek çinko konsantrasyonuna sahip Mueller-Hinton agar veya sıvı besiyerlerinde imipenem ve meropenem gibi karbapenemlerin zon çapının küçüldüğü veya MIC değerinin yükseldiği görülmüştür (3,4,5).

Çalışmada kullandığımız MHA (Oxoid) besiyerinin içerisinde bulunan Fe^{+2} miktarı atomik absorbsiyon metoduyla ölçüldükten sonra standart MHA besiyeri olarak tanımlandı. Daha sonra standart MHA besiyeri içerisindeki Fe^{+2} miktarı EDDHA ile sınırlandırılarak Fe^{+2} miktarı daha az olan bir üretilme ortamı yaratıldı. Bu iki farklı Fe^{+2} konsantrasyonuna sahip MHA besiyerinde değişik antibiyotiklerin *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli* ve *P.aeruginosa* bakterileri üzerindeki hassasiyetleri disk diffüzyon yöntemi ile belirlenerek iki farklı ortamda aynı bakteri suşu için elde edilen zon çapları karşılaştırıldı.

MATERYAL VE METOD

Bakteri suşları : Çalışmada *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli* ve *P.aeruginosa* bakterilerinden değişik klinik materyallerden izole edilen 36'şar suş kullanıldı. İzole edilen bu suşlar Sceptor sistem (Becton Dickinson and Company Sparks Maryland 21152 USA) ile tür düzeyinde identifiye edildi.

Besiyerleri : Çalışmada standart besiyeri olarak Oxoid Mueller –Hinton agar (MHA; CM 337B, Lot no:241603) kullanıldı. Bu besiyerini oluşturan kuru madde içindeki bazı elementlerin ölçümleri Unipath Limited şirketine (Unipath Limited, Kingsland Business Park, Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG248 PW. United Kinghom) yaptırıldı. Gelen sonuçlara göre Oxoid firmasının CM 337 B kodlu ve 241603 lot numaralı MHA besiyerinin 1 gr kuru ağırlığında 33 ppm ($\mu\text{g/ml}$) demir, 0,8 ppm ($\mu\text{g/ml}$) bakır, 16 ppm ($\mu\text{g/ml}$) çinko bulunduğu spektrometrik atomik absorpsiyon yöntemi ile belirlendiği bildirildi.

1000 ml deki Fe^{+2} miktarı şu formüle göre hesaplandı;

1 gr kuru toz MHA 33 $\mu\text{g/ml}$ Fe^{+2} ihtiva ediyorsa 1 Lt MHA besiyeri için yaklaşık 38 gr kuru (dehydrate) besiyeri maddesi kullanıldığı düşünülürse;

1 gr kuru besiyerindeki Fe^{+2} miktarı X 38 gr

solandırırmda kullandığımız sıvı miktarı (1000 ml)

formülüne göre kullandığımız besiyerinde yaklaşık 1.25 $\mu\text{g/ml}$ Fe^{+2} bulunmaktadır.

Antibiyotikler : Antibiyotik diskleri olarak meropenem (10 μg), imipenem (10 μg), ceftriaxone (30 μg), piperacillin/ tazobactam (75 / 10 μg), ofloxacin (10 μg) ve levofloxacin (5 μg) kullanıldı. Gram pozitiflere karşı levofloxacin, gram negatiflere karşı bir kinolon olan ofloxacin diski kullanıldı. Her bir bakteri suşu için iki ayrı besiyeri ortamında zon çapı ölçümleri yapıldı.

Bu anlamda bizim antibiyotik duyarlılık testi için kullandığımız standart MHA sulandırılıp petri kutularına döküldü. Kuru haldeki 50 $\mu\text{g/ml}$ EDDHA maddesi 0,035 M NaOH

içerisinde eritildikten sonra çalışmada kullandığımız besiyeri içerisine otoklavlanmadan önce ilave edildi. Her iki besiyerinin petri kutusundaki ortalama kalınlığı 4 mm'e yakın olmasına dikkat edildi. İzole edilmiş tüm suşlar 0,5 Mc Farland standardında buyyon ile sulandırıldıktan sonra steril serum fizyolojik ile 10^7 cfu/mL'ye yakın bir bulanıklığa getirilerek besiyeri üzerine yayıldı. Antibiyotik duyarlılık testi boyunca tüm zon çapı ölçümleri NCCLS (National Commite for Clinical Laboratory Standard) kurallarına göre yapıldı(1).

İstatistiki değerlendirmeler : Her bir bakteri suşu için standart MHA ve demir miktarı sınırlandırılmış MHA besiyerinden elde edilen zon çapları student t testi yöntemi ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

S.aureus'un standart MHA ve EDDHA ile demir miktarı sınırlandırılmış MHA'da meropenem, imipenem, ceftriaxone, piperacillin/tazobaktam ve levofloksasin gibi antibiyotik disklerine karşı duyarlılıklarını bildiren zon çaplarının ortalamaları Tablo 1'de verilmiştir.

S.aureus suşlarının karbapenem grubundan antibiyotiklere karşı farklı demir konsantrasyonlarında, meropenem'in etkisinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmezken, imipenemin 2 farklı ortamda oluşturduğu zon çapları ortalamaları arasında anlamlı fark tespit edildi ($P<0,05$). Aynı şekilde Piperacillin/tazobaktam ve levofloksasin için belirlenen zon çapları ortalamaları iki farklı ortamda ($P<0,05$) anlamlı, bir sefalosporin olan ceftriaxone için ise, anlamsız ($P>0,05$) bulunmuştur (Tablo 1).

Diğer bir gram pozitif kok olan *S.epidermidis*'in deneylerde kullanılan tüm antibiyotik disklerine karşı 2 farklı besiyeri ortamında oluşturdukları zon çapları arasındaki farklılığın önemli olduğu ($P<0,05$) tespit edildi (Tablo2).

Deneylerde gram negatiflere karşı levofloksasin yerine bir kinolon olan ve gram negatiflere daha etkin olan ofloxacin diski kullanıldı.

E. coli'nin standart MHA ve EDDHA ile demir miktarı sınırlandırılmış MHA'da meropenem, imipenem, ceftriaxone, piperacillin/tazobaktam ve ofloxacin antibiyotik disklerine karşı oluşturduğu zon çaplarının ortalamaları tablo 3'de, *P.aeruginosa* suşlarının sonuçları ise tablo 4'de verilmiştir.

E.coli suşlarının standart ile EDDHA'lı ortamdan elde edilen sonuçları göz önüne alındığında ise, imipenem, meropenem ve ofloksasin disklerine karşı elde edilen 2 farklı ortamdaki zon çapları ortalamaları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmezken ($P>0,05$), piperacillin/tazobaktam'a karşı demir miktarı sınırlandırılmış ortamda *E.coli* suşlarının direncinin, bir sefalosporin olan ceftriaxone karşı ise duyarlılığının arttığı belirlendi ($P<0,05$).

P.aeruginosa suşları demir miktarı sınırlandırılmış MHA besiyerlerinde karbapenem grubu antibiyotiklere karşı dirençlerinin arttığı belirlendi ($P<0,05$). Ceftriaxone, piperacillin/tazobaktam ve ofloxacin disklerinin ise 2 farklı ortamda elde edilen zon çapları ortalamaları karşılaştırıldığında besiyerleri arasında fark olmadığı tespit edildi ($P>0,05$).



Ortalama zon çapları (Standart Sapma)

Antibiyotikler	MHA	EDDHA katılmış MHA	
Meropenem	9.8 ±0.7	9.0 ±0.5	P>0.05
İmipenem	24.4 ±1.9	18.5 ±2.6	P<0.05
Ceftriaxone	11.8 ±1.2	11.5 ±1.3	P>0.05
Piperacillin/tazobactam	17.3 ±1.0	14.2 ±1.7	P<0.05
Levofloksasin	21.0 ±1.5	14.6 ±1.4	P<0.05

Tablo.1. Standart ve EDDHA'lı Mueller-Hinton agar'da *S.aureus*'un antibiyotik zon çapları

Ortalama zon çapları (Standart Sapma)

Antibiyotikler	MHA	EDDHA katılmış MHA	
Meropenem	13.6 ±2.0	10.0 ±1.0	P<0.05
İmipenem	24.6 ±1.8	18.2 ±2.0	P<0.05
Ceftriaxone	11.8 ±1.2	10.0 ±0.8	P<0.05
Piperacillin/tazobactam	20.8 ±1.7	18.7 ±1.8	P<0.05
Levofloksasin	20.0 ±2.2	15.8 ±1.3	P<0.05

Tablo.2. Standart ve EDDHA'lı Mueller-Hinton agar'da *Staphylococcus epidermidis*'in antibiyotik zon çapları

Ortalama zon çapları (Standart Sapma)

Antibiyotikler	MHA	EDDHA katılmış MHA	
Meropenem	19.8 ±0.5	18.8 ±0.9	P>0.05
İmipenem	22.3 ±0.5	21.0 ±0.7	P>0.05
Ceftriaxone	21.8 ±0.7	24.3 ±1.5	P<0.05
Piperacillin/tazobactam	16.5 ±0.9	14.5 ±1.4	P<0.05
Ofloxacin	21.3 ±2.1	19.6 ±1.7	P>0.05

Tablo.3. Standart ve EDDHA'lı Mueller-Hinton agar'da *E.coli*'nin antibiyotik zon çapları

Ortalama zon çapları (Standart Sapma)

Antibiyotikler	MHA	EDDHA katılmış MHA	
Meropenem	21.3 ±1.5	19.5 ±0.8	P<0.05
İmipenem	21.0 ±0.6	18.2 ±0.6	P<0.05
Ceftriaxone	14.1 ±1.1	13.0 ±1.1	P>0.05
Piperacillin/tazobactam	15.5 ±1.3	16.0 ±2.1	P>0.05
Ofloxacin	12.8 ±1.5	13.5 ±1.8	P>0.05

Tablo.4. Standart ve EDDHA'lı Mueller-Hinton agar'da *Pseudomonas aeruginosa*'nın antibiyotik zon çapları

TARTIŞMA

Besiyeri ortamlarındaki farklı demir miktarının mikroorganizmaların üremeleri üzerinde farklı etki gösterdikleri bildirilmiştir. Araştırmalar demir miktarının yalnız bakterilerin üremeleri üzerine değil, aynı zamanda dış membran proteinlerinin sentezi üzerine de etkili olduğunu göstermiştir.

Araştırmacılar ortamdaki serbest demir miktarının azaltılmasıyla, bazı bakterilerin özellikle dış membran proteinlerinin farklı şekillendiğini belirlemişlerdir. Örneğin Warsham ve Konisky'nin *S. typhimurium* ve *E. coli* ile ilgili çalışmalarında üreme ortamındaki serbest demir miktarını sınırladıklarında üreyen yeni jenerasyonun dış membran proteinlerinde bir artış olduğu, *E.coli* suşlarının dış membran proteinlerinde ilk jenerasyondan farklı 83.000 ve 74.000 dalton ağırlığında yeni dış membran proteinleri izole ettiklerini , ağırlığı 83.000 dalton olan bu dış membran proteinlerinden birinin fonksiyonu tam bilinmese de, cir geni tarafından üretilen ve 74.000 dalton ağırlığındaki diğer dış membran proteinin colisin Ia ve Ib için bir reseptör olduğu belirlenmiştir(10).

Bir başka araştırma grubunun *C. jejuni*'nin üreme ortamındaki demir miktarının üreme, morfoloji, dış membran proteinlerin kompozisyonundaki değişiklikleri ile ilgili çalışmalarında, araştırmacılar demir miktarının sınırlandırıldığı ortamlarda *C. jejuni* suşlarının üreme hızlarında yavaşlama, hücre morfolojilerinde değişiklik aynı zamanda ana suşlardan farklı olarak 3 farklı dış membran proteininin (82.000, 76.000, 74.000) sentezlendiği belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmalarda ortamdaki demir miktarının sınırlandırılması değişik konsantrasyonlarda EDDHA katılarak çalışmamızdakine benzer bir şekilde uygulanmıştır(10).

Bakterilerin antibiyotiklerle olan ilişkilerinde dış membran proteinlerinin etkisi geniş ölçüde bilinmekteydi. Dış membran proteinlerinin farklılaşması mikroorganizmaların hücre duvar yapılarındaki temel yapının farklılaşmasına ve dolayısıyla da, antibiyotiklerle olan

duyarlılık sonuçlarının da değişmesine neden olduğu araştırmacılar tarafından belirlenmiştir(12,13,9,6).

İnvitro olarak bakterilerin antibiyotiklerle ilişkilerinde besiyeri içerisindeki inorganik mikro (Zn^{+2} , Mn^{+2} , vb.) ve makro (Na^{+1} , K^{+1} , Cl^{-1} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} vb.) elementlerin miktar farklılıklarının, antibiyotiklerin etki mekanizmalarını etkilediği gibi farklı ortamlarda üretilen aynı tür mikroorganizmaların antibiyotiklere olan duyarlılık sonuçlarının farklılaştığı yapılan çalışmalarla gözlemlenmiştir(3,4,5).

Konu ile ilgili en geniş çalışma Cooper ve arkadaşları(3) tarafından 1993 yılında yapılmıştır. Çalışmada 59 *P. aeruginosa* suşunun Difco ve BBL Mueller – Hinton broth besiyerinde özellikle bir karbapenem grubu antibiyotik olan İmipeneme gösterdiği duyarlılık durumları incelenmiştir .Bu inceleme esnasında çinko miktarı yüksek olan BBL MH besiyerinde *P.aeruginosa* suşlarının, Difco MH besiyeri ile elde edilen MIC sonuçları karşılaştırıldığında BBL MHB elde edilen MIC değerlerinin belirgin bir şekilde yükseldiği tespit edilmiştir. Spektrometrik Atomik absorpsiyon yöntemi ile yapılan ölçümlerde BBL MHA'da çinko miktarı 2.61 µg/ml, Difco MHA'da ise 0.17 µg/ml olarak tespit edilen çalışmada 59 *P.aeruginosa* suşunun kümülatif anlamda imipeneme direnç yüzdesi BBL MHA'da % 33.9, Difco MHA'da 5.1 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın diğer ilginç bir sonucu farklı çinko miktarlarının sefalosporin grubunun *P.aeruginosa* bakterileri üzerine etkilerinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığının tespit edilmesidir.

Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada ise kullanılan duyarlılık test yönteminin farklı olmasına rağmen benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Çalışmada Oxoid MHA besiyerindeki çinko miktarı atomik absorpsiyon aleti ile ölçülmüş (0.45 mg/L) daha sonra ortam çinko asetat ile zenginleştirilerek çinko miktarı 3 mg/L olan bir besiyeri ortamı elde edilmiştir. Disk diffüzyon yöntemi 16 *P.aeruginosa* suşlarının çinko konsantrasyonu farklı iki besiyerindeki, çeşitli antibiyotiklere karşı oluşturdukları zon çapları ölçüldüğünde aynı suşların bu besiyerlerinin özellikle karbapenem grubu antibiyotiklere karşı farklı zon çapları oluşturduğu

görülmüştür. Çinko miktarı 0.45 mg/L olan MHA'da 16 *P.aeruginosa* suşlarının ortalama zon çaplarına bakıldığında meropeneme 26.5 mm, imipeneme 22.0 mm, ceftazidime 20.9 mm ve Piperacilline karşı 21.7 mm çapında, 3 mg/L çinko miktarı olan 2. üreme ortamında ise aynı suşların meropeneme 23.4 mm, imipeneme 19.4 mm, ceftazidime 21.6 ve piperacilline karşı 22.0 mm zon çapları tespit edilmiş olup çalışmada aynı suşların 2 farklı ortamda oluşturdukları zon çapları ortalamalarının karşılaştırılmasında meropenem ve imipenem için istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$), ceftazidim ve piperacillin için ise anlamsız ($P>0.05$) olduğu görülmüştür (5).

Konuya açıklık getirmek amacıyla 1997 yılında Baxter ve Lambert tarafından bir çalışma yapılmış, araştırmacılar ortamdaki serbest çinkonun özellikle karbapenem grubu antibiyotikleri hidroliz sonucu parçalayarak etkilerini azalttığı gibi bir sonuca varılırken özellikle bu etkininde zaman ve ortamdaki çinko konsantrasyonuna bağlı olduğunu savunmuşlardır(14).

Tüm bu çalışmalara rağmen elde edilen verilerin sadece karbapenem grubu antibiyotikler (meropenem, imipenem), *P.aeruginosa* ve çinko üçgeni içerisinde kalmış olması hala soru işaretidir. Çünkü Cooper ve arkadaşları(3) benzer deneyleri diğer gram negatif bakteriler için (*E.coli*, *Klebsiella* ssp . ve diğerleri) yaptıklarında istatistiki olarak anlamlı sonuçlar elde edemediklerini bildirmişlerdir. Baxter ve Lambert(14) adlı araştırmacılar bu çalışmalara istinaden yaptıkları bir araştırmada ortamdaki çinkonun zaman ile paralel olarak karbapenemleri etkisizleştirdiklerini savunmuşlarsa da, niçin *P.aeruginosa* dışındaki gram negatif bakteriler için aynı etki mekanizmasının geçerli olmadığını aydınlatılması gerekmektedir.

Gram pozitiflerden *S. aureus*'un üreme ortamındaki fiziksel ve kimyasal şartların değişmesi sonucu antibiyotiklerle olan ilişkileri incelendiğinde besiyerinin pH değerinin önemli olduğu belirlenmiştir. *S.aureus* suşlarının optimal pH'dan uzaklaşarak (pH 7.1), düşük pH'da (pH 5.2) üretilmesi sonucu suşlarda mevcut ve Penicillin bağlayan proteinlerin bir kısmının belirlenemediği, örneğin pH'7 de üretilen bir suşta Jel elektroforez yöntemi ile 1, 2 ve 3 nolu PBP'ler belirlenirken aynı suşların pH 5,2 de üretilen suşlarının elektroforezi sonucu PBP-2 tespit edilememiştir. Bu da suşların özellikle penisillin grubu antibiyotiklerle olan duyarlılık

ilişkilerinde farklı ortam koşullarında üretilen aynı suşlarda farklı sonuçlar elde edilebileceği kanısına götürmektedir (15).

Pettersson ve arkadaşlarının(16) *N.meningitidis*'in ortamdaki demir limitasyonuna cevabını incelediklerinde diğer araştırmacıların sonuçlarına benzer bir şekilde *N.meningitis* suşlarının dış membran proteinlerinde ana suşlardan farklı olarak 70 Kda ve 98 Kda ağırlığında 2 yeni proteinin sentezlendiğini sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE) analiz yöntemi ile belirlenmiştir.

Bakterilerin üretilip ve duyarlılık testlerinin yapıldığı besiyerleri içerisindeki mikro ve makro elementlerin farklı miktarlarda olması bu mikroorganizmaların yeni jenerasyonlarının dış membran proteinlerine bağlı olarak hücre duvar yapılarının farklı şekillendiği yukarıdaki tartışmalarda yeterince irdelenmiştir. Görüldüğü gibi bir besiyeri ortamındaki Fe^{+2} miktarının da üremenin yanısıra hücre duvarının yapısının proteinleri üzerine etkilidir.

Bu anlamda biz çalışmanın bu kısmında besiyerindeki demir miktarının indirgenmesinin bakteri ve antibiyotik duyarlılığı üzerindeki etkisini incelemek istedik. Çünkü değişik firmalar tarafından üretilen MHA besiyerleri içerisindeki Fe^{+2} miktarlarının birbirinden farklı olduğunu belirledik; örneğin BBL MHA (Lot no: HDWfx) besiyerinde demir konsantrasyonunun 1,17 mg /L, Difco MHA (Lot no: 780100) besiyerinde bu oranın 1,05 mg /L, Oxoid MHA (M405 B, Lot no: 251487) diğer 2 firmanın ürettiği MHB'in 2 katına yakın bir demir olan yaklaşık (2,28 mg/L) olduğu belirlenmiştir. Bu farklılıklardan yola çıkarak elimizde bulunan Oxoid MHA (Fe^{+2} 1,25 mg/L) besiyeri içerisindeki demir miktarını sınırlandırmak koşulu ile ortamı EDDHA ile zenginleştirerek, (50 mg/L) 2 farklı ortamda bazı antibiyotiklerin 4 bakteri üzerine etkisine baktığımızda; Demir miktarının sınırlandırılması sonucu, *S.aureus* suşlarının imipeneme karşı direnç gelişimi olmasına karşın, meropenemin etkisinde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı, yine piperacillin/tazobaktam ile levofloksasin için anlamlı farklar olmakla birlikte, bir sefalosporin olan ceftriaxone için iki farklı üreme ortamında alınan sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, diğer bir gram pozitif kok olan *S.epidermidis*'in kullanılan tüm antibiyotik

disklerine karşı 2 farklı ortamda oluşturdıkları zon çapları arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir.

E.coli suşlarının normal ile EDDHA'lı ortamdan elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında ise, imipenem, meropenem ve ofloksasin disklerine karşı elde edilen 2 farklı ortamdaki zon çapları ortalamaları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmezken, Piperacillin/tazobaktam'a karşı demir miktarı sınırlandırılmış ortamda *E.coli* suşlarının direncinin arttığı, bir sefalosporin olan ceftriaxone karşı duyarlılığın arttığı, ve istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. *P.aeruginosa* suşlarının Fe^{+2} miktarının sınırlandırıldığı ortamda karbapenem grubu antibiyotiklere karşı (meropenem, imipenem) dirençlerinin arttığı gözlemlenmiştir. ($P<0.05$)

Elde ettiğimiz sonuçlar ile bir kez daha belirlenmiştir ki mikroorganizmaların üretilme ortamlarının standardizasyonu önemli bir sorundur. Bakterilerin mikro ve makro element miktarlarının farklı olduğu ortamlarda üretilmeleri sonucu dış membran yapılarının farklı yapılmasından dolayı bu mikroorganizmaların antibiyotiklere olan duyarlılıklarında da farklı sonuçlar elde edilmektedir. Çinko miktarı ile ilgili uluslararası çalışmalar yeterince olmakla birlikte, demir miktarının sınırlandırılması ve antibiyotiklerle ilişkileri ile ilgili yeterli literatür bilgisi olmadığı kanısındayız.

Çalışmamızın bu bölümünde demir miktarını sınırlayarak elde ettiğimiz MHA besiyerinden elde ettiğimiz antibiyotik duyarlılık sonuçlarının standart MHA'da elde ettiğimiz sonuçlarla farklılığının mekanizmasını kesin açıklayamamakla birlikte;

1- Ortamın anyon ve katyon değerinin değişmesine,

2 – Bu değişimin pH derecesi üzerine olan etkisine,

Bunun yanında EDDHA'nın ortamdaki Fe^{+2} miktarını sınırlamasıyla, mikroorganizmalarda meydana gelen dış membran protein miktarındaki artışla birlikte antibiyotiklerin etkisiyle zon çaplarında azalma olduğunu ileri sürebiliriz.

SONUÇ

- ❖ *S.aureus*'un EDDHA katılmış MHA ile standart MHA besiyerindeki antibiyotik zon çapları karşılaştırıldığında karbapenem grubu antibiyotiklerden imipenem, piperacillin/tazobactam ve levofloksasin için EDDHA'nın zon çaplarını azaltmış olduğu ($P<0,05$), meropenem ve ceftriaxone için zon çapları arasında fark olmadığı ($P>0,05$) görülmüştür. Anlamlı fark görülen antibiyotik zon çaplarına (imipenem, piperacillin/tazobactam, levofloksasin) karşı EDDHA katılmış MHA'da standart MHA'a göre antibiyotik zon çaplarında azalma (direnç gelişimi) görülmüştür.
- ❖ *S.epidermidis*'de her iki besiyerinde tüm antibiyotiklere karşı (meropenem, imipenem, ceftriaxone, piperacillin/tazobactam, levofloksasin) zon çapları açısından anlamlı sonuçlar bulunmuştur ($P<0,05$). EDDHA katılmış MHA'da çalıştığımız antibiyotiklere karşı direnç gelişimi görülmüştür.
- ❖ *E.coli* için EDDHA katılmış MHA ile standart MHA'da antibiyotik zon çapları karşılaştırıldığında, sefalosporin grubu olan ceftriaxone ve piperacillin/tazobactam için istatistiksel olarak zon çapları arasındaki fark önemli bulunmuş ($P<0,05$), meropenem, imipenem ve ofloxacin için antibiyotik zon çapları arasında fark olmadığı ($P>0,05$), ayrıca ceftriaxone için EDDHA katılmış MHA'da standart MHA'a göre duyarlılığın arttığı (antibiyotik zon çapında artma) görülmüştür.
- ❖ EDDHA katılmış MHA ile standart MHA besiyerinde *P.aeruginosa* için antibiyotik zon çapları karşılaştırıldığında karbapenem grubu antibiyotiklerden meropenem ve imipenem için istatistiksel olarak önemli bulunmuş ($P<0,05$), ceftriaxone, piperacillin/tazobactam ve ofloxacin için antibiyotik zon çapları arasında farklılığın olmadığı ($P>0,05$) saptanmıştır. Meropenem ve imipenem için zon çapları anlamlı olmakla beraber EDDHA katılmış MHA'da standart

MHA'la kıyaslandığında antibiyotik zon çaplarında azalma (direnç gelişimi) gözlenmiştir.



ÖZET

Çalışmada *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli* ve *P.aeruginosa* bakterilerinin değişik klinik materyallerden izole edilen 36'şar adet suşu kullanıldı. Bu suşların EDDHA katılarak demir kısıtlanması oluşturulan MHA ile standart MHA'lı ortamın antibiyotikler üzerinde etkisini izlemek amacıyla zon çapları istatistiksel olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda içerisine 50 µg/ml EDDHA ekleyerek demir sınırlandırması yaratılan MHA ile standart MHA besiyerinde bakterilerin antibiyotiklerle olan etkileşimlerini inceledik. *S.aureus* ve *S.epidermidis* için meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), ceftriaxone (30 µg), piperacillin /tazobactam (75/10 µg), levofloxacin (5 µg) diskleri kullanıldı. *E.coli* ve *P.aeruginosa* için meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), ceftriaxone (30 µg), piperacillin/tazobactam (75/10 µg), ofloxacin (10 µg) diskleri kullanıldı.

S.aureus suşlarının imipenem, piperacillin/tazobactam ve levofloksasin için antibiyotik zon çapları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş , ceftriaxone ve meropenem için zon çapları arasında farklılık olmadığı görülmüştür.

S.epidermidis suşlarının meropenem, imipenem, ceftriaxone, piperacillin/tazobactam ve levofloksasin için antibiyotik zon çaplarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

E.coli suşlarının ceftriaxone, piperacillin/tazobactam için istatistiksel olarak antibiyotik zon çapları arasındaki fark önemli bulunmuş, meropenem, imipenem ve ofloxacin için ise antibiyotik zon çapları arasında farklılık olmadığı görülmüştür.

P.aeruginosa suşlarının karbapenem grubu antibiyotiklerden meropenem ve imipenem için istatistiksel olarak önemli bulunmuş, ceftriaxone, piperacillin/tazobactam, ofloxacin için ise antibiyotik zon çapları arasında farklılık olmadığı görülmüştür.

SUMMARY

In this study, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* and *P. aeruginosa* isolated from various clinical materials (36 strains from each of them were used). The conditions that was made by reducing iron in vitro, by MHA containing EDDHA (according to the standart conditions with MHA) used to observe the effect on antibiotics on the zone diameters which was evaluated statistically.

By adding 50 µg/ml EDDHA to the standart medium (MHA) we determined the relation ship between the antibiotics and bacteria on the standart MHA medium and the bacteria on the iron limited MHA. Meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), ceftriaxone (30 µg), piperacillin/tazobactam (75/10 µg), Levofloxacin (5 µg) disks were applied for *S. aureus* and *S. epidermidis*.

Meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), ceftriaxone (30 µg) piperacillin/tazobactam (75/10 µg), ofloxacin (10 µg) disks were used for *E. coli* and *P. aeruginosa*.

The antibiotics zone diameters of imipenem, piperacillin/tazobactam and levofloxacin for *S. aureus* strains were statistically significant, there was no difference between the zone diameters of ceftriaxone and meropenem.

The difference between the antibiotics zone diameters of meropenem, imipenem, ceftriaxone, piperacillin/tazobactam and levofloxacin for *S. epidermidis* was statistically significant.

The difference between the zone diameters of ceftriaxone, piperacillin/tazobactam for *E. coli* strains was statistically significant. There was no difference between the zone diameters of meropenem, imipenem and ofloxacin.

Meropenem and imipenem were statistically significant for *P. aeruginosa* strains, there was no difference of ceftriaxone, piperacillin/tazobactam, ofloxacin.

KAYNAKLAR

1. National committee for clinical Laboratory standards .Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing ; 8 th Informational supplement . vol . 18 , no 1 . Pennaylvania : NCCLS, 1998.
2. Phillips I.A. Guide to Sensitivity Testing: Control strains for MIC and disc diffusion methods. 1. baskı. San Diego: Academic press inc, 1991: 29-30
3. Cooper GL, Louie A, Baltch et al. Influence of zinc on *Pseudomonas aeruginosa* susceptibilities to imipenem , J Clin Microbiol, 1993 ; 31 : 2366 – 2370.
4. Daly JS , Dodge RA ,Glew RH , Soja DT , Deluca BA , Heberts . Effect of zinc concentration in Mueller – Hinton agar on susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem . J Clin Microbiol, 1997 ; 35 : 1027 – 1029.
5. Atmaca S . Effect of zinc concentration in Mueller Hinton agar on susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to meropenem . J.Med..Microbiol, 1998 ; 47 : 653.
6. Domenico P, Reich J, Madonia W, Cunha BA. Resistance to bismuth among gram-negative bacteria is dependent upon iron and its uptake, J. Antimicrob. Chemother, 1996; 38: 1031-1040.
7. Salyers AA, Whitt DD, Bacterial Pathogenesis : Iron Acquisition Mechanisms , Washington : American Society for Microbiology, 1994:39-40
8. Brochu A, Brochu N, Nicas TI, Parr TR, Minnick AA, Dolence EK, McKee JA, Miller MJ, Lavoie MC, Malouin F.Modes of action and inhibitory activities of new siderophore-beta- lactam conjugates that use specific iron uptake pathways for entry into bacteria, Antimicrob Agents Chemother, 1992; 36: 2166-2175.
9. Grenier D, Huot M-P, Mayrand D. Iron-Chelating Activity of Tetracyclines and Its Impact on the Susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to These Antibiotics, Antimicrob Agents Chemother, 2000; 44: 763-766.

10. Field LH, Headley VL, Payne SM, Berry LJ. Influence of iron on growth, morphology, outer membrane protein composition, and synthesis of siderophores in *Campylobacter jejuni*, Infection and Immunity, 1986 ; 54 : 126- 132 .
11. Blaser J, Luthy R. Comparative study on antagonistic effect of Low pH and cation supplementation on in vitro activity of quinolones and aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*, J Antimicrob Chemother, 1988; 22: 15-22 .
12. Diarra MS, Lavoie MC, Jacques M, Darwish I, Dolence EK, Dolence JA, Ghosh A, Ghosh M, Miller MJ, Malouin F. Species selectivity of new siderophore-drug conjugates that use specific iron uptake for entry into bacteria, Antimicrob. Agents Chemother, 1996; 40: 2610-2617.
13. Minnick AA, McKee JA, Dolence EK, Miller MJ. Iron transport-mediated antibacterial activity of and development of resistance to hydroxamate and catechol siderophore-carbacephalosporin conjugates, Antimicrob Agents Chemother, 1992; 36: 840-850.
14. Baxter IA, Lambert PA. The effect of zinc on imipenem, J Antimicrob chemother, 1997; 39 : 838-839.
15. Hartman BJ, Tomasz A. low affinity penicillin Binding protein associated with β -lactam resistance in *S. aureus*, J Bacteriology, 1984 ; 158 : 513-516 .
16. Pettersson A , Poolman JT , Ley PV , Tommassen J . Response of *Neisseria meningitidis* to iron limitation ,Microbiol, 1997 ; 71 : 129 –136 .
17. Tsao MS, Sanders GH, Grisham JW. Regulation of Growth of cultured Hepatic Epithelial cells by Transferrin, Experimental cell Research, 1987 ; 171 : 52 – 62 .
18. Hantke K . Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* : K12 : isolation of a constitutive mutant, Mol . Gen . Genet, 1981 : 182 : 288 – 292 .

19. Ernst JF , Bennett RL, Rothfield LI . constitutive expression of the iron – enterochelin and ferric hrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*, J . Bacterial, 1978 ; 135 : 928 –934
 20. Moellering RC , Eliopoylos GM , Sentochnil DE . The carbapenems : new broad spektrum β – lactam antibiotics, J . Antimicrob Chemother, 1989 ; 24 : 1 – 7 .
 21. Schumann G, Möllmann U. Screening System for Xenosiderophores as Potential Drug Delivery Agents in Mycobacteria, Antimicrob Agents Chemother, 2001; 45:1317-322.
 22. Rotheneder A, Fritsche G, Heinisch L, Möllmann U, Heggemann S, Larcher C, Weiss G. Effects of Synthetic Siderophores on Proliferation of *Plasmodium falciparum* in Infected Human Erythrocytes, Antimicrob Agents Chemother, 2002; 46: 2010-2013.
 23. Tsafack A, Libman J, Shanzer A, Cabanchit ZI. Chemical Determinants of antimalarial activity of reversed siderophores, Antimicrob Agents Chemother, 1996; 40:2160-2166.
 24. Golenser J, Tsafack A, Amichai Y, Libman J, Shanzer A, Cabantchik ZI. Antimalarial action of hydroxamate-based iron chelators and potentiation of desferrioxamine action by reversed siderophores, Antimicrob Agents Chemother, 1995; 39: 61-65.
-
25. Emerson LR, Nau ME, Martin RK, Kyle DE, Vahey M, Wirth DF. Relationship between Chloroquine Toxicity and Iron Acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*, Antimicrob Agents Chemother, 2002; 46: 787-796.
 26. David SB, Bricard L, Ramiandrasoa F, DeRoussent A, Kunesch G, Andremont A. Evaluation of growth promotion and inhibition from mycobactins and nonmycobacterial siderophores (Desferrioxamine and FR160) in *Mycobacterium aurum*, Antimicrob Agents Chemother, 1997; 41: 1837-1839.
 27. Newman SL, Gootee L, Stroobant V, van der Goot H, Boelaert JR. Inhibition of growth of *Histoplasma capsulatum* yeast cells in human macrophages by the iron chelator VUF 8514 and comparison of VUF 8514 with deferoxamine, Antimicrob Agents Chemother, 1995; 39: 1824-1829.