

KLEBSIELLA SUŞLARINDA SİDEROFOR VE SERUM DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF SIDEROPHORE AND SERUM RESISTANCE IN *KLEBSIELLA* ISOLATES

İlknur KALELİ

Melek DEMİR

Nural CEVAHİR

Umut YILDIRIM

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

Anahtar Sözcükler: *Klebsiella*, aerobaktin, enterobaktin, serum direnci

Keywords: *Klebsiella*, aerobactin, enterobactin, serum resistance

Geliş: 11 Nisan 2006

Kabul: 05 Haziran 2006

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, *Klebsiella* kökenlerinde siderofor ve serum direncini saptamak idi. Çalışmaya alınan toplam 120 *Klebsiella* kökeninin 80'ni idrar örneklerinden, 40'ı diğer örneklerden soyutlanmıştı. Toplam 120 suşun 90'ı *K. pneumoniae*, 30'u *K. oxytoca* idi. Aerobaktin ve enterobaktin varlığı biyolojik yöntemle araştırıldı. Toplam 120 *Klebsiella* suşunun %30.8'inin aerobaktin, %91.7'sinin enterobaktin sentezlediği bulundu. Enterobaktin sentezi aerobaktin sentezinden daha yüksek bulundu. Suşların %63.3'ünde serum direnci pozitif olarak saptandı.

SUMMARY

The purpose of this study was to determine the production of siderophores and serum resistance in *Klebsiella* strains. Of the total 120 strains 80 were obtained from urinary specimens and 40 from various other specimens. Of the 120 *Klebsiella* isolates, 90 were *K. pneumoniae* and 30 were *K. oxytoca*. Aerobactin and enterobactin production was determined by bioassay method. The production of aerobactin was found in 30.8% and enterobactin in 91.7% of the isolates. Serum resistance was positive in 63.3% of the total strains.

GİRİŞ

Klebsiella türleri özellikle *Klebsiella pneumoniae* toplum kaynaklı ve nozokomiyal infeksiyonların önemli bir nedenidir. *Klebsiella pneumoniae* tüm vücut bölgesinde infeksiyona neden olmakla birlikte, özellikle üriner sistemde ve solunum sisteminde infeksiyonlara neden olur (1, 2). Bakteri infeksiyonu, karışık ve çok faktörlü mekanizmaların rol aldığı bir olaydır. *Klebsiella* türlerinde kapsül antijenleri, farklı adezinler (Tip 1 pili-MSHA), Tip 3 pili (MR/K-HA), non fimbrial adezinler ve agregatif adezin), sideroforlar, serum direnci gibi çeşitli virulans faktörleri tanımlanmıştır (3). Demir bakterilerin büyümesi, çoğalması ve konakta kalıcı infeksiyon oluşumunda temel rol

alır. Patogen bakteriler konaktaki proteinlere bağlı demiri kullanabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Bunların içinde en bilineni sideroforlardır (4-7). Sideroforlar demir bağlama yeteneği olan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Bağırsak bakterilerinde enterobaktin (fenolat) ve aerobaktin (hidroksamat) olmak üzere iki tip siderofor tanımlanmıştır (4, 6). *Klebsiella* türlerinin her iki tip sideroforu sentezledikleri gösterilmiştir (3). *Klebsiella* türlerinin diğer virulans özellikleri yanında serumun bakterisidal etkisine direnç göstermeleri infeksiyon gelişiminde önemlidir.

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden soyutlanmış *Klebsiella* türlerinde siderofor ve serum direncinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma kapsamına toplam 120 *Klebsiella* suşu alındı. Çeşitli örneklerden soyutlanan *Klebsiella* suşları geleneksel yöntemler ile tanımlandı.

Siderofor varlığı (aerobaktin ve enterobaktin) Rabsch ve Reissbrodt (8,9) tarafından tanımlanan biyolojik yöntemle araştırıldı. Aerobaktin için Tris-süksinat besiyeri ve enterobaktin için Vogel – Bonner besiyeri kullanıldı. Aerobaktin için indikatör olarak *Escherichia coli* LG-1522 ve enterobaktin için *Salmonella typhimurium* enb-7 mutant suşları kullanıldı. Aerobaktini araştırmak için hazırlanan özel besiyerine araştırılacak suşun tris-süksinat besiyerinde hazırlanmış olan süspansiyonundan 5 µl ekildi ve 37° C'de bir gecelik inkübasyondan sonra değerlendirildi. Test edilen suşa ait ekimin etrafında besiyerine önceden eklenmiş olan *E. coli* LG-1522 mutant suşunun üremesinin gözlenmesi aerobaktin tip siderofor sentezinin pozitif olduğu yönünde yorumlandı. Enterobaktin varlığını araştırmak için hazırlanan özel besiyerine araştırılacak suşun Vogel-Bonner besiyerinde hazırlanmış olan süspansiyonundan 5 µl ekildi ve 37° C'de bir gecelik inkübasyondan sonra değerlendirildi. Araştırılan suşa ait koloninin çevresinde nutrient agara önceden eklenmiş olan *S. typhimurium* enb-7 mutant suşunun üremesinin gözlenmesi enterobaktin üretimi yönünden pozitif sonuç

olarak yorumlandı (8, 9).

Serum direnci mikroplyt yöntemi ile araştırıldı. Mikroplytin her kuyucuğuna test edilecek suşun hazırlanan süspansiyonundan 50 µl ve önceden elde edilmiş O kan grubu insan serum havuzundan 50µl serum pipetlendi. Tüm suşların bu karışımından 0. dakikada ve çalkalayıcıda 37 °C'de 180 dakika inkübe edildikten sonra kanlı agara ekimleri yapıldı. Suşların kanlı agardaki üremeleri başlangıç değerinin %1'ine düşmüşse seruma duyarlı, 180 dakika sonunda bakterilerin %90'dan fazlası yaşıyorsa seruma dirençli olarak değerlendirildi (10).

BULGULAR

Toplam 120 *Klebsiella* suşunun 80'i idrar örneklerinden, 40'ı diğer örneklerden soyutlanmıştır. Suşların 90 tanesi *K. pneumoniae* ve 30 tanesi *K. oxytoca* olarak tanımlandı.

Toplam 120 *Klebsiella* suşunun %30.8'inde aerobaktin ve %91.7'sinde enterobaktin üretimi pozitif bulundu. Serum direnci %63.3 olarak saptandı. Suşların virulans özellikleri Tablo1, 2 ve 3'te verilmiştir.

TARTIŞMA

Fırsatçı patojenlerden olan *Klebsiella* türleri özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ve hastaneyle iliş-

Tablo 1. *Klebsiella* türlerinin virulans özellikleri

Tür	Aerobaktin (pozitif)		Enterobaktin (pozitif)		Serum direnci (pozitif)	
	n	%	n	%	n	%
<i>K. pneumoniae</i> (n=90)	34	37.7	82	91.1	54	60
<i>K. oxytoca</i> (n=30)	3	10	28	93.3	22	73.3
Toplam (n=120)	37	30.8	110	91.7	76	63.3

Tablo 2. *Klebsiella* suşlarının farklı örneklere göre siderofor ve serum direnci özelliği

Örnek	Aerobaktin (pozitif)		Enterobaktin (pozitif)		Serum direnci (pozitif)	
	n	%	n	%	n	%
İdrar (n=80)	23	28.8	72	90	52	65
Balgam (n=12)	2	16.6	12	100	9	75
Diğer (n=28)	12	42.8	26	92.8	12	42.8
Toplam (n=120)	37	30.8	110	91.7	76	63.3

Tablo 3. Farklı örneklerden soyutlanmış *Klebsiella* türlerinin siderofor ve serum direnci özellikleri

Tür	Aerobaktin (pozitif)		Enterobaktin (pozitif)		Serum direnci (pozitif)	
	n	%	n	%	n	%
<i>K. pneumoniae</i> İdrar (n=56)	20	35.7	50	89.3	33	58.9
Balgam (n=8)	2	25	8	100	8	100
Diğer (n=26)	12	46.1	24	92.3	13	50
Toplam (n=90)	34	37.7	82	91.1	54	60
<i>K. oxytoca</i> İdrar (n=24)	3	12.5	22	91.7	19	79.2
*Balgam (n=4)	0	-	4	-	1	-
*Diğer (n=2)	0	-	2	-	2	-
Toplam (n=30)	3	10	28	93.3	22	73.3

* Sayı düşük olduğundan yüzdeler verilmemiştir.

kili enfeksiyonlarda, diyabetli hastalarda ve kronik pulmoner obstrüksiyon varlığında ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Klebsiella* türleri nozokomiyal bakteri enfeksiyonları arasında %3-7 oranında enfeksiyon oluşturmaktadır (3). Nozokomiyal *Klebsiella* enfeksiyonları özellikle üriner ve solunum sistemi ile ilişkilidir. Bu her iki konak bölgesi de konak savunma mekanizmalarının yoğun olarak bulunduğu alanlardır. Patojenik *Klebsiella* türleri konağın savunma mekanizmalarını kırarak adezinler, LPS, kapsül, serum direnci ve sideroforlar gibi çeşitli virulans faktörleri salgırlar (3). Sideroforlar düşük molekül ağırlıklı demir şelatörleri olarak bilinmektedirler. Hidroksamat tip siderofor aerobaktin ve fenolat tip enterobaktin en iyi bilinenlerdir (4, 6). Gram-negatif bakterilerin bir grubu düşük oranda (%20'nin altında) aerobaktin sentezlerken *E. coli* gibi diğer bir grubun ise %40'ın üzerinde aerobaktin sentezlediği bildirilmiştir (3).

Klebsiella türlerinin de hem aerobaktin hem de enterobaktin sentezlediği gösterilmiştir. *Klebsiella* suşlarının çoğunun enterobaktin sentezlediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (11-16). Bu çalışmada tüm suşların %91.7'si, *K. pneumoniae* suşlarının %91.1 ve *K. oxytoca* türlerinin %93.3'ünün enterobaktin ürettiği, buna karşılık, tüm suşların %30.8, *K. oxytoca* suşlarının %10 oranında aerobaktin sentezlediği saptanmıştır (Tablo 1). *Klebsiella* suşlarında % 5.3-8 arasında aerobaktin varlığını bildiren çalışmalar (11, 12, 15) yanında %65, %50 oranında aerobaktin pozitifliği bildiren çalışmalar da vardır (13, 17). Otuzdört *K. pneumoniae* suşunda biyolojik yöntemle siderofor sentezi araştırılan bir çalışmada, suşların tümünün enterobaktin sentezlediği, tüm suşların %50'sinin aerobaktin sentezlediği, üriner örneklerin %31, kan

örneklerinin %67'sinin aerobaktin sentezlediği bildirilmiştir (17). Anđ-Küçüker ve ark. (12) 26 *Klebsiella* suşunda yaptıkları çalışmalarında tüm *Klebsiella* türlerinde siderofor üretimini pozitif bulduklarını, suşların %8'nin aerobaktin ürettiklerini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *K. pneumoniae* suşlarının %10 oranında aerobaktin ürettiği belirtilmiştir (12). Sunulan bu çalışmada *K. oxytoca* suşlarında *K. pneumoniae* suşlarına göre daha düşük oranda aerobaktin saptanmıştır (Tablo 1 ve 2). Çalışmada idrar örneklerinde tüm suşlarda %28.8 oranında aerobaktin pozitif saptanırken, aynı örneklerde *K. pneumoniae* suşlarında %35.7 ve *K. oxytoca* suşlarında %12.5 oranında aerobaktin pozitifliği saptanmıştır (Tablo 2 ve 3).

Biyolojik yöntemle yapılan siderofor çalışmalarında çeşitli indikatör suşlar kullanılmaktadır. Koczura ve Kaznowski (17) çalışmalarında indikatör suş olarak *E. coli* LG1522 kullanıldığında rodotoruluk asit aracılığı ile aerobaktin sentezinin uyarıldığını aynı çalışmayı *Aerobacterium flavescens* JG-9 ile yaptıklarında suşların hiç birinde aerobaktin sentezine rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bu durum farklı çalışmalardaki oranlar arasındaki farklılığı açıklayabilir. Farklı çalışmalarda kullanılan yöntem ve çalışmacıların kullandıkları indikatör suşun özelliği pozitiflik oranını belirliyor olabilir. Bu durumun başka çalışmalarla ve moleküler yöntemler ile desteklenmesi uygun olacaktır. Bu çalışmada aerobaktin için indikatör suş olarak *E. coli* LG1522 kullanılmıştır. Sonuçlar, Koczura ve Kaznowski (17)'nin sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Sideroforlar diğer bakterilerde olduğu gibi *Klebsiella* türleri içinde önemli bir virulans faktörüdür. Bakteriler konağın demir kaynaklarından hemoglobin,

transferrin ve laktoferrinden demiri sideroforlar aracılığı ile alırlar. Yapılan bir çalışmada *K. pneumoniae* suşlarının her üç demir kaynağını kullanabildiklerini, bazı suşların hemoglobin ve transferrinden demir alamazken, tüm suşların %97'sinin laktoferrinden demir kazanımı sağladıkları bildirilmiştir (17). Diğer Gram-negatif bakteriler için aerobaktin tip siderofor üretiminin bakterilerde konak demirini kullanmada önemli bir virulans faktörü olduğu ancak *Klebsiella* türleri için aerobaktin aracılıklı demir kazanımının patojeniteye indirekt katkı sağladığını belirten yayınlar olmakla birlikte (3), *K. pneumoniae* suşlarında patojenitede aerobaktinin temel rol aldığını belirten çalışmalar da vardır (18). Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Klebsiella* klinik suşlarında aerobaktin sentezinin yüksek bulunması ve özellikle laktoferrinden demir elde edildiğinin gösterilmiş olması önemli görülmektedir (17). Bu çalışmada da klinik *Klebsiella* suşlarında aerobaktin, diğer Gram-negatiflerde bildirilmiş olan oranlar kadar yüksek olmasa da beklenenden yüksek bulunmuştur.

İnfeksiyon gelişimi sırasında konak savunmasının ilk basamaklarından biri polimorfonükleer lökositler aracılığı ile fagositoz ve serumun bakterisidal etkisidir. Serumun bakterisidal etkisi temel olarak kompleman proteinleri ile ilişkilidir. Çoğu kommensal Gram-negatif bakteri seru-

mun bakterisidal etkisine duyarlı iken patojenik suşlar dirençlidir. Bu direnç mekanizmalarında hangi faktörlerin rol oynadığı tam olarak bilinmemekle birlikte, dış membran proteinlerinden porinler, Tra T lipoproteinlerin, kapsüler yapının ve O antijeninin rol aldığı dair kanıtlar vardır (3). Lipopolisakkarit O yan zincirindeki değişikliğin serum direncinde etkili olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada tüm suşların %63'de *K. pneumoniae* suşlarının %60'da serum direnci saptanmıştır (Tablo 1). Türkiye'de yapılan çalışmalarda *Klebsiella* suşlarında %29-%77 oranında serum direnci bildirilmiştir (12, 16). Podschun ve ark. (15) çalışmalarında *K. oxytoca* suşlarında %53, klinik *K. pneumoniae* suşlarında %25 serum direnci bildirmişlerdir. Serum direncinin ozmolarite ile değiştiği bildirilmiştir. Aynı bakteri suşunun farklı ortamlarda seruma duyarlılığının değişebileceği ve çevresel faktörlerin kompozisyonu ve LPS'in serum direncini etkilediği belirtilmektedir (3).

Gram-negatif bakterilerde çeşitli virulans faktörlerinin varlığı konak patojen ilişkisinde ve hastalığın şiddetinde önemlidir. Bu çalışmada suşların tamamına yakınının enterobaktin ürettikleri ve önemli bir oranının da aerobaktin ürettikleri bulunmuştur. *Klebsiella* türlerinde diğer virulans özellikleri yanında her iki tip sideroforun varlığının önemli olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1997: 171-252.
2. Erdem B. Enterobacteriaceae. Ustaçelebi Ş, ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*'de. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 471-517.
3. Podschun R, Ullman U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 589-603.
4. Neilands JB. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 1995; 270: 26723-6.
5. Wooldridge KG, Williams PH. Iron uptake mechanism of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 12: 325-48.
6. Erdem B. Bakterilerde sideroforlar ve diğer demir alım sistemleri. *İnfek Derg* 1996; 10: 101-3.
7. Neilands JB. Siderophores. *Arch Biochem Biophys* 1993; 302: 1-3.
8. Rabsch W, Reissbrodt R. Biotest zum Nachweis von hydroxamat-Fe-chelatoren (Aerobactin). *J Basic Microbiol* 1985; 25: 663-7.
9. Rabsch W, Reissbrodt R. Investigations of *Salmonella* strains from different clinical-epidemiological origin with phenolate and hydroxamate (aerobactin) siderophore bioassays. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1988; 32: 353-60.
10. Puzova H, Siegfried L, Kmetova M, Filka J, Takacova V, Durovicova J. Fimbriation, surface hydrophobicity and serum resistance in uropathogenic strains of *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994; 9: 223-9.
11. Podschun R, Fischer A, Ullmann U. Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different sources. *Zentralbl Bakteriol* 1992; 276: 481-6.
12. Anđ Küçükler M, Küçükbasmacı B, Tekin M, Akbulut D, Büyükbaba-Boral Ö, Anđ Ö. Üropatojen *Klebsiella* suşlarının serotiplendirilmesi, siderofor sentezi, serum direnci ve genişlemiş spektrum betalaktamaz tayini. *Türk Mikrobiol Cem Derg* 2002; 32: 265-9.
13. Jaya B, Sanjay C. Siderophore production by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Ind J Med Microbiol* 1995; 13: 34-6.

14. **Tarkkanen AM, Allen BL, Williams PH, et al.** Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. *Infect Immun* **1992**; 60: 1187-92.
15. **Podschun R, Pietsch S, Holler C, Ullmann U.** Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl Env Microbiol* **2001**; 67: 3325-7.
16. **Anđ Küçüker M, Topal A, Törümküney D ve ark.** Prematüre yenidoğanlardan alınan klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarının özellikleri. *Infek Derg* **1999**; 13: 549-54.
17. **Koczura R, Kaznowski A.** Occurrence of the Yersinia high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Pathog* **2003**; 35: 197-202.
18. **Nassif X, Sansonetti PJ.** Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun* **1986**; 54: 603-8.

İLETİŞİM

Dr. Melek DEMİR
Siteler M Barboros C, Yenibahçelievler Sitesi
C1 Blok No. 3
20100 Kınıklı, DENİZLİ
e-posta: mdemir@pamukkale.edu.tr