

## ***Escherichia coli* ATCC 11230 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P Bakterilerinin Tıpta Kullanılan Bazı İmplant Metallerine Karşı Affinitelerinin İncelenmesi**

**Çağrıhan UTLU<sup>1</sup>, D. Ekin TAŞATAN<sup>1</sup>, Tansel ÖZTÜRK<sup>2</sup>,  
D. Seyfettin ALDAĞ<sup>1</sup>, İsmail KARABOZ<sup>3</sup>**

### **Özet**

Bu çalışmada implant hammadeleri (endüstriyel isimleri 316L, 14T6, 0.5T6, Normal alüminyum ve Duralüminyum) üzerinde *E. coli* ATCC 11230 ve *S. aureus* ATCC 6538-P bakterilerinin üremesi ve bu metallere karşı affiniteleri incelenmiştir. Normal alüminyum ve duralüminyum üzerinde *E. coli* 'nin çok rahat ve sağlam bir biçimde tutunabildiği, *S. aureus* 'un ise 0.5T6 metalinde yıkama sonrasında çok daha yüksek miktarda implant üzerinde kalabildiği sonucu bulunmuştur. Bu durum bize normal alüminyum ve duralüminyumdan yapılan implantların *E. coli* enfeksiyonu için, 0.5T6 metalinden yapılan implantların ise *S. aureus* enfeksiyonu için riskli olduğunu göstermiştir.

### **Giriş**

İmplantlar; tıpta, özellikle ortopedi pratiğinde (örneğin kemik ve eklemlerin konjenital anatomik bozukluklarında, kompleks kemik kırıklarında vb.) sıkça kullanılan, genellikle metal alaşımlı protezlerdir. Metal implant kullanılan hastalarda, implantın yerleştirilmesi ya da kullanılması sırasında sıkça karşılaşılan bir sorun, metal implantın bakterilerce kontamine edilip, hastada enfeksiyona ulaşmasıdır. İmplantla bağlı bakteriyel enfeksiyonlardan en sık sorumlu iki ajan *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* olarak izole edilmiştir (1, 2, 3).

---

<sup>1</sup> İzmir Fen Lisesi, Bornova – İzmir

<sup>2</sup> Arş. Gör., Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İzmir.

<sup>3</sup> Prof. Dr., Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İzmir. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-posta adresi: [karaboz@sci.ege.edu.tr](mailto:karaboz@sci.ege.edu.tr)

*Staphylococcus aureus*, genellikle, iltihap oluşumuyla seyreden lokal enfeksiyonlara neden olur (örneğin; fronkül, karbonkül, yara enfeksiyonları, sinüzit, orta kulak iltihabı, mastitis puerperalis gibi enfeksiyonlar). Hemotojen (nadiren) veya posttravmatik (sıklıkla) osteit/osteomyelit, kalp ameliyatlarından sonra ülseroz endokardit (örneğin protez kalp kapakçığı takılanlarda); hastanede oksijen cihazına bağlı hastalarda veya grip sonrası pnömoni; bağışıklık sistemi yetmezliklerinde septisemiden sorumludur. Hastanede yatan hastalarda görülen septisemilerin yaklaşık yarısında etken olarak *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* hemen hemen eşit sorumludurlar (3, 4, 5, 6, 7).

Damar içi kateter, protezler, "shunt" ventilleri gibi yabancı cisimler *Staphylococcus aureus* bakterileri ile kolonize olabiliyorlar. Bu bakterilerin bu cisimlere yerleşmeleri, implant yabancı cisimlerin yüzeylerini çok kısa sürede kaplayan fibrinojen, fibronektin ve ya laminin gibi konağa ait matriks proteinlerine spesifik olarak bağlanmayla başlar. Bu bağlanmayı izleyerek oluşan biofilmle birlikte etken yayılır (1, 2, 5, 8, 9).

*E. coli*, insanda bağırsak hastalıkları ve bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olur. *E. coli*, uygun koşullarda endojen enfeksiyonlara neden olan fakültatif patojen veya fırsatçı patojen bir bakteri olarak kabul edilmektedir. En sık rastlanan bağırsak dışı *Escherichia coli* enfeksiyonu idrar yolu enfeksiyonudur. *Escherichia coli* 'ler, ayrıca, safra kesesi, safra yolları iltihaplanmaları, yara enfeksiyonları, apandisit, peritonit, yeni doğanda menenjit ve sepsis etkenidirler. Nozokomiyal enfeksiyon kavramı, hastanede yatmakta olan hastanın hastanede kaldığı süre içinde edindiği enfeksiyonu tanımlar. Eş anlamlı diğer terimler "hastanede kazanılan enfeksiyonlar", "hastane enfeksiyonu", "enfeksiyöz hospitalismus"dur. Bu enfeksiyonlar, hastanede tedavi edilmekte olan hastalığın komplikasyonu olarak ortaya çıkan ikincil enfeksiyonlardır. Nozokomiyal enfeksiyonların büyük bir bölümünden fakültatif patojen, yani fırsatçı mikroorganizmalar sorumludurlar. Nozokomiyal enfeksiyonlar, hastanın kendi florasından (endojen enfeksiyonlar) veya dışarıdaki başka kaynaklardan (ekzojen enfeksiyonlar) kaynaklanabilir. Endojen enfeksiyonlar daha sık görülür. Hasta, enfeksiyon etkenini kendisi dışarıdan hastaneye getirebilir. Fakat sıklıkla, hastaneden yatmakta olan hastanın deri ve mukozaları kısa zamanda genellikle çoğul dirençli, hastane tipi belirli bakteriler tarafından kolonize edilir. Hastaya takılmış olan tüm implant ve benzeri protezler de bu kolonizasyona maruz kalabilir. Bu bakteriler hastaya ait florayı baskırlarlar. Endojen enfeksiyonların çoğu da hastaneye özgü flora tarafından oluşturulmaktadır. Ekzojen enfeksiyonların enfeksiyon kaynağı olarak hastane personelinin önemi büyüktür. Genellikle, mikroorganizmaların hastadan hastaya taşınması tıbbi bakım sırasında ellerle gerçekleşmektedir. Personelin kendisinin enfekte olması veya hastane tipi mikroorganizmayla kolonize edilmiş olması enderdir. Nozokomiyal enfeksiyonların önemli nedenleri arasında enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların vücut içine girebildiği medikoteknik girişimler de sayılabilir. Bu tip girişimlere idrar torbası, venöz ve ya diğer kateterlerin kullanılması, yapay solunum, organ nakli, implantlar/protezler vb. örnek olabilir. Tüm invaziv tanı yöntemleri de enfeksiyon riskini birlikte getirmektedir. Hasta odasının havası, yeri ve duvarları gibi hastanın diğer çevresinin enfeksiyon kaynağı olarak rolü hayli önemsizdir(5, 6, 9, 10).

Ortopedi pratiğinde kullanılmakta olan metal alaşımlı implantlar hakkında, bugün için bir çok değerli bilgiye sahibiz. İlk paslanmaz çelik olan 18-8 (günümüz sınıflandırmasında 302), korozyona karşı vanadyum çeliğinden daha dayanıklıdır. Bundan sonra da

vanadyum çeliği kullanımından vazgeçilmiştir. Daha sonra 18-8s Mo paslanmaz çeliği üretilmiş ve bu çelikte, korozyona karşı dayanıklılığı arttırmak için az miktarda molibden de kullanılmıştır. Daha sonra bu çeliğe 316 L adı verildi ve 1950 'lerde çelikteki karbon oranı, klorlu çözeltilere ve korozyona karşı dayanıklılığı arttırmak için %0.08 'den en fazla %0.03 'e düşürülmüştür. Korozyona karşı dayanıklılığı sağlayacak en küçük krom oranı %11'dir. Kromun reaktif bir metal olmasına rağmen, alaşımları %30 'luk nitrik asit testinden olumlu sonuç almayı başarmıştır. İmplant yapımında en geniş kullanım alanına sahip paslanmaz çelikler 316 ve 316L'dir. Isıl yöntemlerle sertleştirilmez fakat soğuk işlemlerle sertleştirme sağlanabilir. Bu grup paslanmaz çelik teller, manyetik değildir ve diğerlerinden daha iyi bir korozyon direncine sahiptir. Molibden içeriği, tuzlu sudaki korozyon direncini artırır. 316 ve 316L paslanmaz çelikleri arasındaki tek fark, yapılarındaki maksimum karbon içeriğinin farklı olmasıdır(%0.03- %0.08) ( 11, 12, 13, 14).

Lokal doku tepkileri ve hatta potansiyel metabolik, immünolojik ve bakteriyolojik etkiler, paslanmaz çeliğin implantasyonu ile düzenlenir. Bundan sorumlu ajanlar, metallerin kendileri değil korozyona bağlı olarak ortaya çıkan ürünlerdir. Bu elementlere karşı yüksek duyarlılıklar görülebilir fakat implantlarda çok sık görülen bir durum değildir. Titanyum implantların kullanımına ilişkin ilk denemeler 1930'ların sonlarına dayanır. Titanyum kedi femurlarındaki tolere edilme oranı, paslanmaz çelik veya vanadyumundaki ile aynıdır. Titanyum (yoğunluğu 4.5g/cm) mekanik ve kimyasal özellikleri, implant uygulamaları için idealdir(12, 13, 14).

1985-1988 döneminde ABD'den Horan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, cerrahi işlemler sırasında meydana gelen nozokomiyal enfeksiyonların %9.8'inden *E. coli*, %17.3 'ünden *S. aureus* 'un sorumlu olduğu gösterilmiştir (1) Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda; bu enfeksiyon tablolarının oluşmasında söz konusu bakterilerin patojen suşlarının metal implantlara karşı olan affinitesinin araştırılması; bu enfeksiyonların nedeninin anlaşılıp önlenmesinde yeni kapılar açabilecektir.

## **Materyal ve Metot**

Bu çalışmada test organizması olarak *Escherichia coli* ATCC 11230 ve *Staphylococcus aureus* 6538 P tip türleri kullanılmıştır.

Çalışmamızda implant hammaddelerinden 316 L, 16 T6, 0.5 T6, Normal alüminyum ve Duralüminyum kullanılmıştır.

Kullanılan implant hammaddeleri nutrient broth besiyerine yerleştirilerek sterilize edilmiştir. Her bir metal türü için iki bakteri türünün üremesini ve metal üzerine tutunmalarını gözlemek için, sterilizasyondan sonra besiyerine organizmalar aşılanmış ve 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hem metal yüzeyinde üremiş olan bakterileri, hem de o metale tutunmuş olanları gözlemek için, aynı bakterinin bir tür metalle olan preparatlarından 2 adet hazırlanmıştır. Bu preparatlardan bir tanesi direkt mikroskopik inceleme.; diğeri ise sadece tutunan bakterileri görmek amacıyla distile suda

yıkandıktan sonra mikroskopik inceleme yapmak amacıyla kullanılmıştır. Bakteri sayımları Leitz Wetslan Ortoplan Polarize tip mikroskopta yapılmış olup; bakteri sayımında Breed Yöntemi kullanılmıştır. Sayımda kullanılan mikroskopun Mikroskopik Faktörü 3600 olarak hesaplanmıştır. Bakteri sayımları: MF x n formülü ile (adet/cm<sup>2</sup>) olarak hesaplanmıştır (MF=mikroskopik faktör; n=görüş alanındaki ortalama mikroorganizma sayısı) (15, 16, 17).

## Sonuçlar

Hazırlanan besiyeri içinde inkübasyona bırakılan implantların, yıkama yapılmadan direkt ışık mikroskopik incelemeleri sırasında yapılan Breed sayımlarının sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Tabloda yer alan değerler her bir görüş alanında tespit edilen bakteri sayısıdır. Buna göre elde edilen görüntüler için mikroskopik faktör 3600 olarak hesaplanmıştır. Toplam 10 adet görüş alanı incelenmiştir.

Tablo 1. Yıkama yapılmayan preparatlarda bakteri sayımı (adet/görüş alanı)

	0.5 T 6		14 T 6		316 L		Normal Al.		Duralüminyum	
	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.
1	12	10	8	15	11	18	23	25	17	20
2	17	8	6	6	13	8	19	18	18	25
3	11	15	10	8	12	14	17	23	20	19
4	10	11	6	12	9	13	20	27	16	13
5	18	20	12	16	11	17	22	15	23	21
6	15	13	10	12	15	0	26	28	16	26
7	14	12	15	7	12	11	21	26	21	18
8	12	4	9	11	10	18	25	24	19	20
9	14	16	11	2	11	12	18	19	15	24
10	10	14	16	9	17	19	20	25	23	20
Toplam	133	123	103	98	121	130	211	230	188	206
Ort.	13,3	12,3	10,3	9,8	12,1	13	21,1	23	18,8	20,6

0.5 T 6, 14 T 6, 316 L, Normal Al. ve Duralüminyum kullanılan metallerin isimlerini belirtmektedir.  
S.a. : *Staphylococcus aureus*, E.c. : *Escherichia coli*  
1,2,3,... : Görüş alanı sayısı

Sayım sonuçları, Breed yöntemine göre değerlendirilip 1 cm<sup>2</sup> deki bakteri sayısı bulunmuştur. Bu veriler; Tablo 2'de belirtilmiştir.

Tablo 2. Yıkama yapılmayan preparatlardaki bakteri sayıları

İmplant tipleri	0.5 T 6		14 T 6		316 L		Normal Al.		Duralüminyum	
	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.
Adet/cm <sup>2</sup>	47880	44280	37080	35280	43560	46800	75960	82800	67680	74160

Hazırlanan besiyeri içinde inkübasyona bırakılan implantların yıkama yapılarak direk ışık mikroskopik incelemeleri sırasında yapılan Breed sayımlarının sonuçları Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Yıkama yapılmış olan preparatlarda bakteri sayımı (adet/görüş alanı)

	0.5 T 6		14 T 6		316 L		Normal Al.		Duralüminyum	
	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.
1	8	5	5	2	9	9	20	15	16	19
2	11	6	0	3	5	10	17	19	14	17
3	10	6	6	8	7	8	19	21	14	19
4	9	10	8	5	6	9	24	14	18	13
5	7	4	4	6	7	7	18	19	15	21
6	5	0	6	5	8	10	20	24	16	18
7	14	8	1	9	6	4	21	25	14	17
8	10	6	3	6	8	8	20	27	16	15
9	12	5	3	5	7	10	17	21	20	20
10	15	8	2	2	6	7	18	20	19	14
Toplam	101	58	38	51	69	82	194	205	162	173
Ort.	10,1	5,8	3,8	5,1	6,9	8,2	19,4	20,5	16,2	17,3

0.5 T 6, 14 T 6, 316 L, Normal Al. ve Duralüminyum kullanılan metallerin isimlerini belirtmektedir.  
S.a. : *Staphylococcus aureus*, E.c. : *Escherichia coli*  
1,2,3,... : Görüş alanı sayısı

Tabloda yer alan değerler, her bir görüş alanında tespit edilen bakteri sayısıdır. Bu gözlemede sadece metale kimyasal olarak tutunmuş mikroorganizmaları ayırt etmek için, örnekleri incelemeye önce distile suda yıkama işlemi uygulanmıştır.

Sayım sonuçları, Breed yöntemine göre değerlendirilip 1 cm<sup>2</sup> deki bakteri sayısı bulunmuştur. Bu veriler; Tablo 4'de belirtilmiştir.

Tablo 4. Yıkama yapılan preparatlardaki bakteri sayıları

İmplant tipleri	0.5 T 6		14 T 6		316 L		Normal Al.		Duralüminyum	
	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.	S.a.	E.c.
Bakteri										
Adet/cm <sup>2</sup>	36360	20880	13680	18360	24840	29520	69840	73800	58320	62280

İstatistiksel çalışmalarda Non-parametrik testler kullanılmış olup sonuçlar ekte gösterilmiştir.

Tablolar arasında istatistiksel bir farklılık olup olmadığı Mann-Whitney U-Testi ile incelenmiştir. Buna göre Tablo-1 ve Tablo-3 arasında bir farklılık olmadığı saptanmıştır.

Daha sonra organizmalar arasındaki farklılık Kruskal Wallis testi ile sınanmıştır. Buna göre de gruplar arasında farklılıklar olduğu belirlenmiştir.

Yaptığımız sayımlarda beklenen bir sonuç, yıkama yapılmış olan preparatlarda bir görüş alanındaki bakteri sayısının azlığı olmuştur. Bu sonuç o ortamdaki bakteri popülasyonunu sadece belirli bir kısmındaki metale kimyasal bir biçimde yapışabildiğini göstermektedir. İmplant operasyonu sonrasında görülen enfeksiyon tablosunda bu yapışan bakterilerin daha etkili olabilecek şekilde yorumlanabilecek olan bu sonuç; tüm implant metallere aynı biçimde gözlenmektedir. Duralüminyum ve normal alüminyum metallere hem de yıkamasız grupta üreyen *E. coli* miktarının çok fazla olduğu dikkat çekicidir (5,8'e karşın 20,5 ve 17,3 gibi). Öte yandan aynı metal gruplarındaki (duralüminyum ve normal alüminyum) *E. coli* popülasyonunda, diğer gruplara nazaran, yıkamayla çok daha düşük miktarda bir azalma gözlenmektedir. Hatta normal alüminyum grupları arasındaki yıkama farkı sadece 0.1'dir. Bu sonuç *E. coli* 'nin duralüminyum ve normal alüminyum üzerinde çok rahat ve sağlam bir biçimde tutunabildiği şeklinde yorumlanabilir. Öte yandan *S. aureus* 'un 0.5 T 6 metalinde yıkama sonrasında çok daha yüksek miktarda implant üzerinde kalabildiği sonucu da gerçekten ilginçtir.

## Tartışma

Yıkama yapılan gruplarda metalin üzerinde kalan bakteri miktarının azalması beklenebilecek bir sonuçtur. Öte yandan metalin üzerinde yıkamaya rağmen iyice tutunabilen bakterilerin enfeksiyon oluşturma potansiyeli açısından daha tehlikeli olmaları açıktır. Duralüminyum ve normal alüminyum metallere *E. coli* 'nin yıkamaya rağmen üremesi, yıkamadan diğer metallere olduğu kadar etkilenmemesi, gerçekten de çok dikkat çekicidir. Bu sonuç, söz konusu iki metal türlerinden yapılan implant materyallerinde *E. coli* enfeksiyonu riskinin çok büyük olduğu şeklinde yorumlanabilir (1, 13).

0.5 T 6 metalindeyse sadece *S. aureus* 'un yıkamaya rağmen fazla miktarda kalabilmesi, bu metalden yapılan implantların *S. aureus* enfeksiyonu için gayet riskli olduğu şeklinde yorumlanabilir (11, 12).

Bakteriyel patojenitenin artışıyla, bu bakterilerin buldukları ortamdaki sayılarının fazlaşması arasındaki doğru orantı göz önüne alınarak; yapılacak daha ileri boyutta araştırmalarla, hangi metal implantta hangi bakterinin daha rahat ürediği bilgisi edinilerek, implant sonrası karşılaşılan hastane kaynaklı enfeksiyonların önlenmesinde yeni adımlar atılabilecektir.

## Kaynaklar

1. Kaper, J.B., A. D. O., 1998. *Escherichia coli*: O157: H7 and other shiga toxin producing *E. coli* strains, Washington, D.C., ASM Pres,C.
2. Pelczar, M.J., 1977. Microbiology, Mc Grow- Hill , New York.
3. Bilgehan, H., 1981. Genel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi , Ege Üniversitesi, İzmir.
4. Holt, J.G., 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology , Williams&Wilkins.
5. Unat, E.K., 1998. Genel tıp mikrobiyolojisi ve infeksiyon hastalıkları bilimi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
6. Bilgehan, H., 1986.Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları, İzmir.
7. Palmer, M.B., 1984.Infection control:a policy and procedure manual, Philedelphia, W.B. Saunders.
8. Burrows W., 1973.Textbook of Microbiology, Philedelphia, W.B. Saunders.
9. Unat, E.K., 1987. Tıp bakteriyolojisi ve virolojisi: insanda hastalık yapan virüsler ve bunlarla oluşan infeksiyon hastalıkları, Dergah Tıp Yayınları, İstanbul.
10. Salyers, A.A., Whitt, D.D., 1995.Bacterial pathogenesis: a molecular approach, Washington, ASM.
11. Planck, H., Daunar, M., Renardy, M., 1990. Medical Textiles for Implantation, Berlin, New York, Springer -ö Verlag
12. Erden, S., 2001. Metal ve kompozit kemik plaklarının kırık kaynamasına etkilerinin nümerik olarak incelenmesi, Ege Üniversitesi, İzmir.
13. Sun, C. T., Sankar, B. V., Rojapakse, Y.D.S., 1995. Dynamic response and behavior of composites, American Society of Mechanical Engineers , 12-17
14. Kaw, A. K., 1997. Mechanics of Composite Materials , Boca Raton , CRC
15. Gürgün,V., Halkman, A.K., 1990. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, Gıda Teknolojisi Derneęi, Yayın No: 7, Basım ve Grafik, Ankara
16. Guyer, M.F., 1953. Animal Microbiology : Practical exercises in zoological micro-technique, University of Chicago, Chicago.
17. Tamer , A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oęultekin , R.,1989, Mikrobiyoloji Laboratuar Klavuzu, 3.Baskı Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Teks. Ser. No:55, İzmir, 260 say

## Ekler

### NPar Tests Mann-Whitney Test

VAR00002	N	Mean Rank	Sum Of Ranks
TABLO1 1,00	50	48,56	2428,00
2,00	50	52,44	2622,00
Total	100		
TABLO2 1,00	50	50,58	2529,00
2,00	50	50,42	2521,00
Total	100		

### Test Statics<sup>a</sup>

	TABLO1	TABLO3
Mann-Whitney U	1153,000	1246,000
Wilcoxon W	2428,000	2521,000
Z	-,670	-,028
Asymp. Sig. (2tailed)	-,503	-,978

İki Değişken arasında farklılık yoktur. Bundan dolayı bir bütün olarak alınabilir

### NPar Tests

#### Descriptive Statics

	N	Mean	Std.Deviation	Minimum	Maximum
TABLO1	100	15,4300	5,92931	,00	28,00
TABLO3	100	11,3300	6,55367	,00	27,00
VAR00001	100	3,0000	1,42134	1,00	5,00

### Kruskal-Wallis Test

#### Ranks

VAR00001	N	Mean Rank
TABLO1 1,00	20	37,00
2,00	20	23,00
3,00	20	36,67
4,00	20	82,40
5,00	20	73,43
Total	100	
TABLO3 1,00	20	37,42
2,00	20	17,63
3,00	20	37,00
4,00	20	86,10
5,00	20	74,35
Total	100	



Test Statics<sup>a,b</sup>

	TABLO1	TABLO3
Chi-Square	63,716	77,998
df	4	4
Asymp. Sig.	,000	,000

a. Kruskal-Wallis Test

b. Grouping Variable: VAR00001

Gruplar arasında farklılık vardır

	1	2	3	4	5
1	-	Fark var	Fark yok	Fark var	Fark var
2	-	-	Fark var	Fark var	Fark var
3	-	-	-	Fark var	Fark var
4	-	-	-	-	Fark yok