

**MAJOR ÜROPATOJENLERE KARŞI CORNUS MAS L.
(KIZILCIK)'İN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

***Investigation of Antimicrobial Activity of Cranberry Juice
Against Major Uropathogens***

Nizami DURAN¹

*1 (Prof. Dr.); Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Hatay-Türkiye, nizamduran@hotmail.com*

Öz: Giriş ve Amaç: Esherichia coli, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa ve Proteus mirabilis önemli üriner sistem infeksiyonları etkenleridir. Bu üropatojenler ciddi morbidite ve mortalite etkenlerindedir. Bu patojenler ülkemizde olduğu gibi tüm dünyada önemli üropatojenler arasında yer almaktadır. Bu etkenlerdeki ilaç direnci sebebiyle çoğu zaman tedavide ciddi problemler yaşanmaktadır. Biz bu çalışmada kızılçık suyunun üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen ilaç duyarlı ve dirençli patojenlere karşı antimikrobiyal etkinliğini araştırmayı amaçladık. Material ve Yöntem: Çalışmada ilaç standart kökenler ticari olarak temin edilirken ilaç duyarlı ve dirençli bakteri kökenleri olarak laboratuvar izolatları kullanılmıştır. Mikroorganizmaların izolasyonları aerobik koşullarda Mueller-Hinton agar, Kanlı agar ve Eosin Metilen Blue agar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada her bir bakteri kökeninden 12'şer suş seçildi. Bu suşlar hem ilaç dirençli hem de ilaç duyarlı kökenlerden oluşmaktaydı. Mikroorganizmaların MIC ve MBC değerleri CLSI kriterlerine uygun olarak tespit edildi. Result: Çalışmada hem ilaç duyarlı hem de ilaç dirençli bakteriyel kökenlere karşı kızılçık suyunun dikkate değer ölçüde antimikrobiyal etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada Esherichia coli, Klensiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa ve Proteus mirabilis suşlarına karşı minimal inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) 8-32 µg/ml arasında olduğu tespit edilirken, Minimal Bakterisidal Konsantrasyonlarının (MBK) 16-64 µg/ml arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bunun yanında Kızılçık suyunun bu üropatojenlerden Esherichia coli, Proteus mirabilis ve Pseudomonas aeruginosa gibi mikroorganizmaların biofilm formasyonu üzerinde de etkili olduğu tespit edilmiştir. Sonuç: Literatürde Esherichia coli'ye karşı etkinliği bildirilen kızılçık suyunun in-vitro koşullarda Esherichia coli ile birlikte önemli üropatojenler arasında gösterilen Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis ve Klebsiella pneumonia'ya karşı önemli antimikrobiyal etkinliğinin olduğu tespit edilmiştir. Özellikle kızılçık suyunun bu infeksiyon etkenlerinin sebep olduğu üriner sistem infeksiyonlarının profilaksisi ve korunmada faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Kızılçık Suyu, Antimikrobiyal Aktivite, Üropatojenler, Esherichia Coli, Pseudomonas Aeruginosa, Proteus Mirabilis ve Klebsiella Pneumonia

Abstract: Background& Aim: Esherichia coli, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa and Proteus mirabilis are important agents of urinary tract infections. These uropathogens can be considered as serious morbidity and mortality agents. These microorganisms are take place among the major uropathogens as in our country and all over the world. Drug resistance in these microorganisms often leads to serious problems in treatment. In this study, we aimed to investigate the antimicrobial activity of cranberry juice against both drug resistant and drug-sensitive pathogens isolated from urinary tract infections. Material and Method: Standard origins were obtained commercially. In addition,

drug-resistant and sensitive bacterial strains were isolated from clinical samples. Isolations of microorganisms were performed by using different media (Mueller-Hinton agar, Blood agar and Eosin Methylene Blue agar) under aerobic conditions. 12 strains were selected from each bacterial origin. These strains consisted of both drug-resistant and drug-sensitive strains. Furthermore, the standard origins of these bacterial strains were used as control strains. MIC and MBC values of all microorganisms were determined according to CLSI criteria. Results: In this study, it was determined that cranberry juice showed significant antimicrobial activity against both drug sensitive and drug resistant bacterial strains. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) values of cranberry juice were found to be between 8-32 µg/ml against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* strains. The minimal bactericidal concentrations of cranberry juice (MBC) against these same origins were found to be between 16 and 64 µg/ml. In addition, it has been determined that cranberry juice was effective on the biofilm formation potentials of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Conclusion: Cranberry juice, which has been reported to be effective against *Escherichia coli* in the literature, has been found to have significant antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae*, which are shown among the important uropathogens in-vitro. From these results, we think that cranberry juice may be useful in prophylaxis and prevention of urinary tract infections caused by these infectious agents.

Keywords: Cranberry Juice, Antimicrobial Activity, Uropathogens, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Proteus Mirabilis* and *Klebsiella Pneumonia*

GİRİŞ

İdrar yolu enfeksiyonları en sık karşılaşılan bakteriyel enfeksiyonlar arasında yer almaktadır. İdrar yolu enfeksiyonu idrar sisteminde başlayan bir enfeksiyon olarak tanımlanır. İdrar yolu enfeksiyonları solunum yolu enfeksiyonlarından sonra ikinci en yaygın görülen enfeksiyonlardır. İdrar yolu böbrekler, üreterler, mesane ve idrar yollarından oluşmaktadır. Sağlıklı insanlarda idrar yolunun üstündeki idrar yolunun tüm alanları sterildir, dolayısıyla idrar normalde sterildir (Stamm and Norrby 2001; Foxman 2014)

Enfeksiyon genellikle bakterilerin üretradan girmesi ve çoğalmasıyla ortaya çıkar. Üretra ile sınırlı bir enfeksiyon üretrit tablosunu oluşturmaktadır. Bakteriler mesaneye hareket edip çoğalırsa, mesane enfeksiyonu, sistite neden olur. Enfeksiyon hemen tedavi edilmezse, bakteriler üremelerine devam ederek böbreklere ulaşmakta ve piyelonefritlere neden olabilmektedir (Foxman 2010).

İdrar yolu enfeksiyonlarının başlıca ajanları bakteriler olsa da, mantar ve protozonlar da bu tür enfeksiyonlara yol açabilmektedirler. İdrar yollarını en sık enfekte eden bakteriler özellikle Gram negatifler bakteriler olup, bunlar arasında *Escherichia coli* üriner sistem enfeksiyonlarının başlıca sebebidir. Bunun dışında *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da diğer önemli üriner sistem enfeksiyon etkenleri arasında sayılabilir (Hooton 2012).

İdrar yolu enfeksiyonu tüm dünyada oldukça yaygın bir hastalıktır. Çeşitli antibiyotiklerle devam eden tedavi yan etkilere neden olabilmektedir. Enfeksiyona neden olan bakterilerin, ilacın uzun süre geliştirebileceği de bilinmektedir. Bu konular farklı tedavi yöntemleri ve alternatif tedavilerin sürekli araştırılmasına yol açmıştır. İdrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde profilaktik olarak uzun yıllardan beri birçok doğal ürünün kullanıldığı bilinmektedir (Levison and Kaye 2013).

Bu doğal ürünlerden biri de kızcıktır [*Cornus mas* (Linnaeus)]. Kızcık şimdye kadar üzerinde birçok çalışma yapılmış bir bitkidir. Yapılan çalışmalarda çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Bitkilerin idrar yolu enfeksiyonlarının önlenmesinde ve tedavi edilmesinde çok etkili oldukları kanıtlanmıştır. Kızcık ürünlerinin günlük olarak tüketilmesinin idrar yolu enfeksiyonundan korunmada faydalı olabileceğini bildirilen çalışmalar mevcuttur (Walker et al., 1997).

İlk önceleri kızcık suyunun idrar pH'sını düşürdüğü ve böylelikle enfeksiyonlardan koruduğu düşünülürdü. Bu olay, kızcık suyunda bulunan asid metabolizması yoluyla hippürik asit oluşumuna yol açmasına bağlanmaktaydı. Daha sonra yapılan çalışmalarda ancak çok büyük miktarlarda kızcık suyu alımının idrardaki hippürik asit konsantrasyonunun antibakteriyel etki için yeterli olabileceğini göstermiş dolayısıyla bu görüş zayıflamıştır. Daha sonraları yapılan çalışmalarda kızcıkta bulunan bazı proantosiyanidinlerin *Escherichia coli*'nin tip 1 P-fimbrialarının üroepitelyal hücrelere bağlanmasını inhibe ettiği ve böylece üriner sistem içinde mikroorganizmanın adezye olmasının engellendiği bildirilmiştir (Howell et al., 1998; Lee et al., 2000; Gupta et al., 2007; Juthani-Mehta M et al., 2016; Juthani-Mehta M et al., 2010; Jepson et al., 2012).

Biz bu çalışmada *Cornus mas* L. (kızcık ekstresi)'in üriner sistem enfeksiyonlarından en sık izole edilen, idrar yolu enfeksiyonlarının major etkenleri arasında gösterilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Proteus mirabilis*'e karşı antimikrobiyal etkinliğini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla ilaç duyarlı ve dirençli izolatlar ile standart kökenler kullanıldı. Bunun yanında *Cornus mas* L.'in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın biofilm formasyonu üzerinde de etkisi de araştırılmıştır.

MATERYAL & YÖNTEM

Çalışmada standart kökenler ticari olarak temin edilirken, ilaç duyarlı ve dirençli bakteri kökenleri olarak laboratuvar izolatları kullanılmıştır. Mikroorganizmaların izolasyonları aerobik koşullarda Mueller-Hinton agar, Kanlı agar ve Eosin Metilen Blue agar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada her bir bakteri kökeninden 12'şer suş seçildi. Bu suşlar hem ilaç dirençli hem de ilaç duyarlı kökenlerden

oluşmaktaydı. Mikroorganizmaların MIC ve MBC değerleri CLSI kriterlerine uygun olarak tespit edildi.

***Cornus mas* L. Ekstresi**

Kızılcık meyvesi ticari olarak temin edildi. Kızılcık 37 °C'de 72 saat süreyle inkübatöre konularak suyunun uçurulması sağlandı. Daha sonra bitki homojenizatörde homejenize edilerek ekstresi çıkarıldı. Bu ekstre bi-distile su içinde çözülerek kullanıldı. Kızılcık ekstresinin hazırlanması için 200 gr tartılarak cam kavanozlara konuldu ve çözücü olarak üzerlerine 1000 ml metanol eklendi. Hazırlanan karışım bir gece çalkalayıcıda karıştırılarak süspansiyon hazırlandı. Daha sonra kızılcık süspansiyonu iki kat tülbentten süzülerek süspansiyondan bitki parçacıkları uzaklaştırıldı. Daha sonra ise elde edilen süspansiyondaki metanol evaporatörde uçurularak, bitki ekstraktları elde edildi. Elde edilen ekstratlar kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi.

Bakteri Kökenleri

Çalışmada bakteri kökenleri olarak 12 ilaç duyarlı, 12 ilaç sensitif kökenin yanında standart bakteri suşları da kullanıldı. Çalışmada Amikasin dirençli *E.coli*, *P.aeruginosa* ve *Klebsiella pneumonia* izolatları ile Ampisilin dirençli *P.mirabilis* kökenleri kullanıldı. İlaç duyarlı ve dirençli kökenler olarak laboratuvar izolatları kullanıldı. Standart bakteri kökenleri ise ticari olarak temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan standart kökenler:

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Proteus mirabilis ATCC 29245

Klebsiella pneumonia ATCC 138883

MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyonu) Belirlenmesi

MİK değeri bakteri çoğalmasını inhibe edebilen en düşük konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Kızılcık ekstresinin *Esherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Proteus mirabilis*'e karşı MİK konsantrasyonları mikrodilüsyon broth yöntemine göre belirlendi. Kızılcık ekstresi sırasıyla 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 µg/ml'lik konsantrasyonları Mueller-Hinton broth besiyeri içinde hazırlandı. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ içeren tüm tüplere 0.5 McFarland standardına ayarlanmış bakteri süspansiyonları eklendi. Bütün mikrodilüsyon tüpleri 24 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda, her bir tüpten bakteriyel örnekler Mueller-Hinton

agar plakları üzerine inoküle edildi. Üreme bulanıklığı görülmeyen son dilüsyon MİK değeri olarak belirlendi.

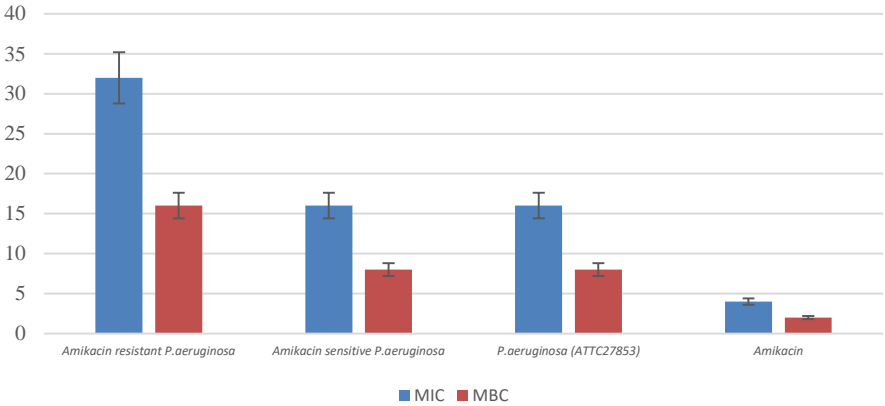
Antimikrobiyal Etkinlik ve Biyofilm Deneşleri

Standart kökenler dahil olmak üzere tüm izolatların MİK değeri belirlenmesi CLSI kriterlerine göre yapıldı (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015). Bakteri suşları Mueller-Hinton agarda 37°C sıcaklıkta, bir gecelik inkübasyonla çoğaltıldı. Üretilen bakteri kolonilerinden alınarak, %0.9'luk sodyum klorür çözeltisinde, 0.5 McFarland değerinde süspansiyonlar hazırlandı. Biyofilm oluşumu O'Toole (O'Toole, 2011) tariff ettiği yöntemle göre yapıldı (O'Toole 2011).

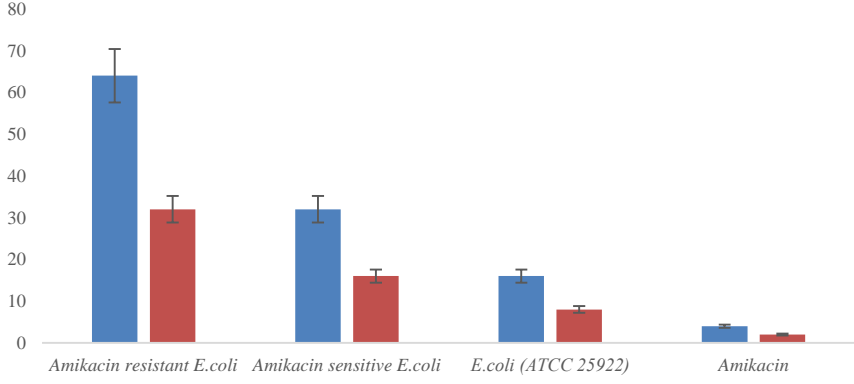
BULGULAR

Çalışmada hem ilaç duyarlı, hem de ilaç dirençli bakteriyel kökenlere karşı kızılılık ekstresinin dikkate değer ölçüde antimikrobiyal etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada *Esheria coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Proteus mirabilis* suşlarına karşı minimal inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) 16-64 µg/ml arasında olduğu tespit edilirken, Minimal bakterisidal konsantrasyonlarının (MBK) 8-32 µg/ml arasında değiştiği tespit edilmiştir (Figür 1-4).

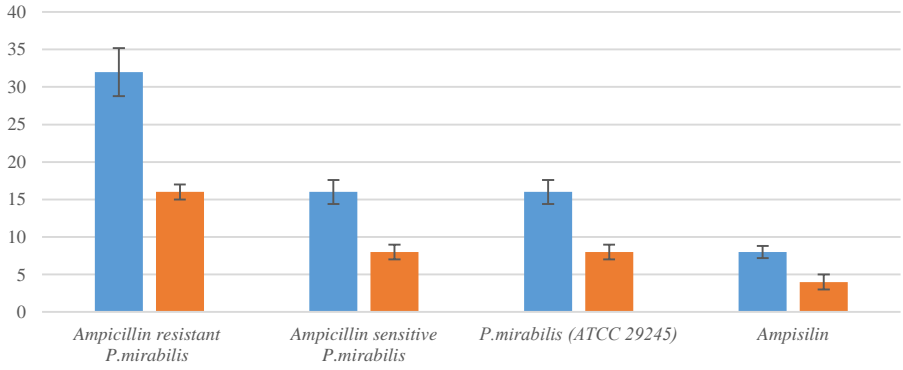
Figür 1. *Cornus mas* L. ekstresinin *P.aeruginosa* kökenlerine karşı MİK ve MBK değeri.



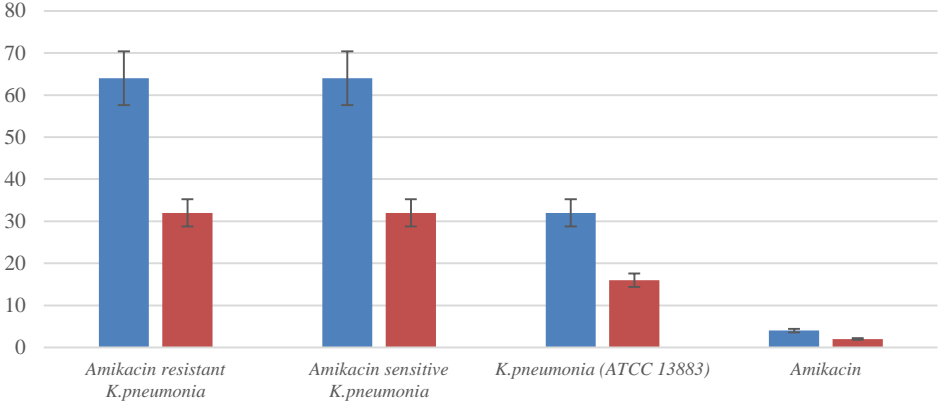
Figür 2. *Cornus mas* L. ekstresinin *E.coli* kökenlerine karşı MİK ve MBK değerleri.



Figür 3. *Cornus mas* L. ekstresinin *P.mirabilis* kökenlerine karşı MİK ve MBK değerleri.

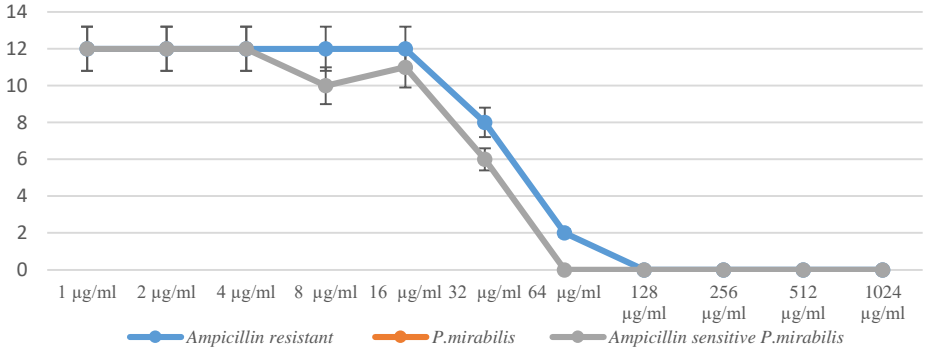


Figür 4. *Cornus mas* L. ekstresinin *K.pneumonia* kökenlerine karşı MİK ve MBK değerleri.



Bunun yanında *Cornus mas* L. ekstresinin bu üropatojenlerden *Esheria coli*, *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi mikroorganizmaların biofilm formasyonu üzerinde de etkili olduğu tespit edilmiştir.

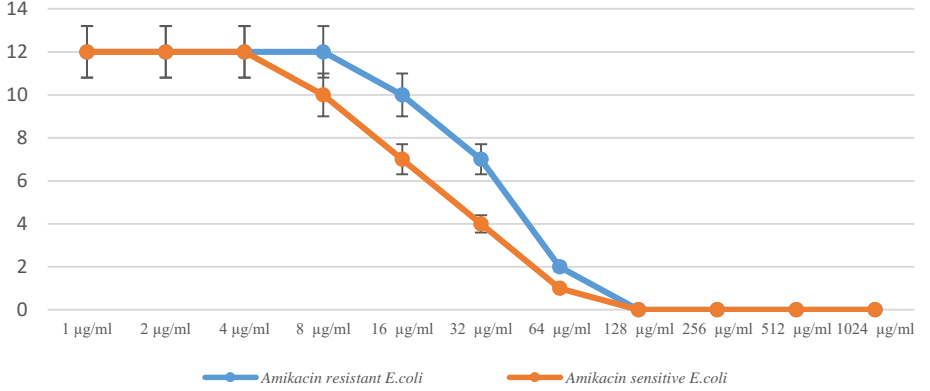
Figür 5. Farklı konsantrasyonlarda *Cornus mas* L. ekstresinin *P.aeruginosa* kökenleri üzerinde biofilm formasyonuna etkileri.



Figür 5’de de görüleceği üzere, çalışmada Amikasin dirençli *P.aeruginosa* kökenlerinin üzerinde *Cornus mas* L. ekstresinin 16 µg/ml düzeyinde biofilm oluşumu üzerinde etkisinin olmadığı tespit edilirken, *Cornus mas* L. ekstre konsantrasyonu 128 µg/ml’ye çıkarıldığında *P. aeruginosa* kökenlerinin biofilm üretmedikleri tespit edilmiştir. Biofilm oluşumunu inhibe eden doz amikasin duyarlı kökenlerde yine benzer

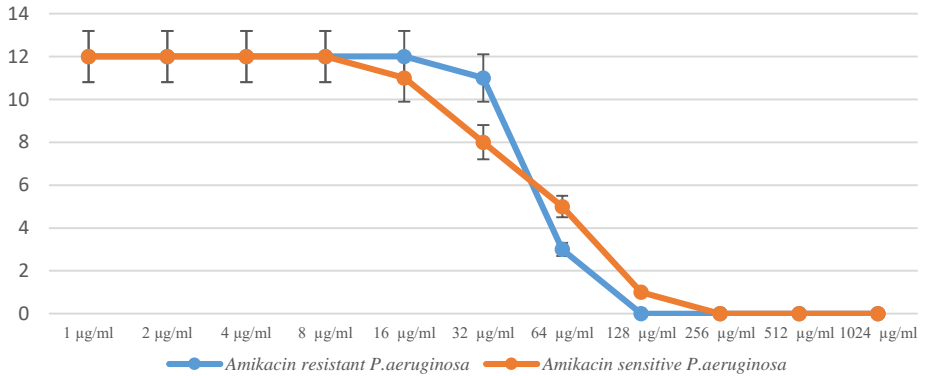
olarak 128 µg/ml iken, standart kökenlerin biofilm üretmesinin 32 µg/ml düzeyinde inhibe edildiği tespit edildi.

Figür 6. Farklı konsantrasyonlarda *Cornus mas L.*'in *E.coli* kökenleri üzerinde biofilm formasyonuna etkileri.



Figür 6’da ise Amikasin dirençli ve duyarlı *E.coli* kökenlerinin biofilm oluşturma yeteneklerinin 128 µg/ml düzeyinde *Cornus mas L.* ekstresi kullanımıyla inhibe olduğu tespit edilirken, standart kökenlerin biofilm üretme yeteneğinin 16 µg/ml düzeyinde inhibe edildiği tespit edildi.

Figür 7. Farklı konsantrasyonlarda *Cornus mas L.*'in *P.aeruginosa* kökenleri üzerinde biofilm formasyonuna etkileri.



Figür 7’de ise Ampisilin dirençli *Proteus mirabilis* kökenlerinin biofilm oluşturma yeteneklerinin 128 µg/ml düzeyinde *Cornus mas L.* ekstresi kullanımıyla inhibe olduğu tespit edilirken, Ampisilin duyarlı kökenler ile standart kökenlerin biofilm üretme yeteneklerinin ise 64 µg/ml düzeyinde inhibe edildiği tespit edildi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

İdrar yolu enfeksiyonlarının tüm dünyada her yıl yaklaşık 150 milyon insanı etkilediği hesap edilmektedir. Özellikle komplike idrar yolu enfeksiyonlu bireylerde majör bakteriyel etkenler arasında sayılan *E.coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde görülen yüksek antibiyotik direnci bu tür enfeksiyonların tedavisini de her geçen gün güçleştirmektedir. Bu sebeple idrar yolu enfeksiyonları patojenlerine karşı antibiyotik dışında alternatif profilaktif yolların aranması hem hasta sağlığı açısından, hem de artan ilaç direncine karşı önemli bir çözüm noktası olacaktır.

Literatürde *Esheria coli*'ye karşı etkinliği bildirilen *Cornus mas L.* ekstresinin *in-vitro* koşullarda *Esheria coli* ile birlikte önemli üropatojenler arasında gösterilen *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* ve *Klebsiella pneumonia*'ya karşı önemli antimikrobiyal etkinliğinin olduğu tespit edilmiştir. Özellikle *Cornus mas L.* ekstresinin bu enfeksiyon etkenlerinin sebep olduğu üriner sistem enfeksiyonlarının profilaksisi ve korunmada faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Walker, E.B., Barney, D.P., and Mickelsen JN. (1997). Cranberry concentrate: UTI prophylaxis. J Family Pract.,45: 167-168.
2. Howell, A.B., Vorsa, N., Der Marderosian, A. and Foo, L.Y. (1998). Inhibition of the adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelialcell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries. N Engl J Med., 339: 1085-1086.
3. Lee, Y. L., Owens, J., Thrupp, L., and Cesario, T.C. (2000). Does cranberry juice have antibacterial activity? JAMA, 283(13): 1691.
4. Gupta, K., Chou, M.Y., Howell, A., Wobbe, C., Grady, R. and Stapleton, A.E. (2007). Cranberry products inhibit adherence of p-fimbriated *Escherichia coli* to primary cultured bladder and vaginal epithelial cells. J Urol., 177 (6): 2357-2360.
5. Juthani-Mehta, M., Van Ness, P.H. and Bianco, L. (2016). Effect of cranberry capsules on bacteriuria plus pyuria among older women in nursing homes: a randomized clinical trial. JAMA. doi:10.1001/jama.2016.16141
6. Juthani-Mehta, M., Perley, L., Chen, S., Dziura. J. and Gupta, K. (2010). Feasibility of cranberry capsule administration and clean-catch urine collection in long-term care residents. J Am Geriatr Soc., 58 (10): 2028-2030.
7. Jepson, R.G., Williams, G. and Craig, J.E. (2012). Cranberries for preventing urinary tract infections. Cochrane Database Syst Rev., 10:CD001321.

8. O'Toole, G. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J. Vis. Exp.*, 3-5.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute 2015. "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement". The clinical and laboratory standards institute (CLSI).
10. Stamm, W.E. and Norrby, S.R. (2001). Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis.*, 183 (Suppl 1): S1-S4.
11. Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect Dis Clin North Am.*, 28: 1-13.
12. Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Rev Urol.*, 7: 653-660.
13. Hooton, T.M. (2012). Uncomplicated urinary tract infection. *New Engl J Med.*, 366: 1028-1037.
14. Levison, M.E. and Kaye, D. (2013). Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant Gram-negative uropathogens. *Curr Infect Dis Rep.*, 15: 109-115.