T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ESCHERİCHİA COLİ'NİN 025b-ST131 KLONUNUN VE CTX-M-15 BENZERİ GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETALAKTAMAZIN PCR İLE BELİRLENMESİ

Özlem GÜLLER

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Akgün YAMAN

ADANA-2021

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ESCHERİCHİA COLİ'NİN 025b-ST131 KLONUNUN VE CTX-M-15 BENZERİ GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZIN PCR İLE BELİRLENMESİ

Özlem GÜLLER

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Akgün YAMAN

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2019-11507 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez no:…….
ADANA-2021

KABUL ONAY

ETİK BEYANI

Canım Babam

Zeki GÜLLER'e ithafen

(Sana söz verdiğim gibi)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleriyle yetişmemde büyük katkı sağlayan, emeği geçen, tezimin son aşamasına kadar bana yol gösteren, her konuda desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğr. Üyesi **Prof. Dr. Akgün YAMAN**'a anlayışı ve desteği için teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince hoşgörü, bilgi ve tecrübeleriyle yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım **Prof. Dr. Fatih Köksal**, **Prof. Dr. Fügen YARKIN**, **Prof. Dr. Macit İLKİT, Doç. Dr. Filiz Kibar**'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tecrübeleri ve kıymetli bilgi birikimiyle bana ışık tutan, hoşgörü ve sevgiyle paylaşan ve bana yol gösteren **Dr. Öğr. Üyesi Ayşe SEZA İNAL**'a

Her konudaki destek ve katkılarından dolayı, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum bölüm sekreterimiz **SunaGÖKMEN**'e ve **değerli arkadaşlarıma**

Tezimin istatistiksel analizine sağladığı önemli katkılarından ötürü **Arş. Gör. Hülya BİNOKAY**'a PCR analizinde bilgi ve teknik imkânlarını benimle paylaşan **Metin CEYHAN** ve **Onur UÇAR**'a

Tezimdeki pozitif kontrol suşunu temin etmemize yardımcı olan Sayın Prof. **Dr. Özgen ESER KÖSEOĞLU**'na

Sevgileri ve destekleri ile bana cesaret veren omzumda herzaman ellerini hissettiğim **güzel insanlara**

Yaşadığım tüm zorlukları aşmamda en büyük emeği olan anlayışlı ve sabırlı tutum ve ürettiği çözümlerle kahramanlarım sevgili annem **Nurten GÜLLER**, canım kardeşlerim **Özgül GÜLLER KASA, Caner GÜLLER ve Ezgi GÜLLER**'e

Tez çalışmamı bitirmemde bana sonsuz destek veren ve hayatımızın her döneminde yanımızda olan eniştem **Mustafa Kamil KASA**'ya

Varlıklarıyla hayatıma sevinç ve güzellik katan, iyi ve kötü günümde vazgeçilmezlerim canım kızlarım **Yağmur SARI, Açelya KASA ve İlayda KASA**'ya

Sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Özlem GÜLLER

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY ii
ETİK BEYANI iii
TEŞEKKÜR iv
İÇİNDEKİLER v
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
TABLOLAR DİZİNİ x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xi
ÖZET xii
ABSTRACT xiii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. *Escherichia Coli* 4
2.1.1. Antijenik yapı ve tiplendirilmesi 4
2.2. Yüzey virülans faktörleri (Virotyping) 5
2.2.1. Mannoz Duyarlı Fimbria 6
2.2.1.1. Tip 1 Fimbria 6
2.3. Patogenez ve İmmünite 8
2.3.1. Virülans faktörleri 8
2.3.1.1. Endotoksin 8
2.3.1.2. Kapsül 9
2.3.1.3. Antijenik Faz Varyasyonu (antijenik değişim) 9
2.3.1.4. Tip III Sekresyon Sistemleri 9
2.3.1.5. Çoğalma faktörlerinin temini 10
2.3.1.6. Serumun öldürücü etkisine direnç 10
2.3.2. Antimikrobiyal Direnç 11
2.3.2.1. Antimikrobiyal direncin genetik temelleri 12
2.3.2.2. Mutasyon direnci 12
2.3.2.3. Horizontal (yatay) gen transferi 13
2.3.3. β-laktam antibiyotikler 14
2.3.3.1. β-laktamazların Sentezi, Transferi ve Etki Mekanizması 14

2.4. Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları;..... 15
2.4.1. İlacı İnaktive Eden Enzimlerin Üretimi..... 15
2.4.2. Hedef Moleküllerde Değişiklik Meydana Gelmesi..... 16
2.4.3. Hücreye Giren İlaç Miktarının Azalması (Permeabilitenin Azalması)..... 16
2.4.4. Hücreye Giren Antibiyotiğin Dışarı Pompalanması..... 16
2.5. β-laktamazların Sınıflandırılması..... 16
2.6. Geniş Spektrumlu β-laktamaz (GSBL)..... 20
2.6.1. GSBL TİPLERİ..... 22
2.6.1.1. TEM..... 22
2.6.1.2. SHV..... 23
2.6.1.3. OXA..... 23
2.6.1.4. PER..... 24
2.6.1.5. CTX-M..... 24
2.6.1.5.1. CTX-M Kronolojisi..... 25
2.6.1.5.2. CTX-M GSBL'ler..... 26
2.6.1.5.3. CTX-M Enzimlerinin Filogenetik grupları ve Orjinleri..... 27
2.7. GSBL'lerin belirlenmesi..... 28
2.7.1. GSBL Doğrulama Testleri..... 29
2.8. Tedavi..... 31
2.9. Fenotipik Özellikler..... 32
2.9.1. β-laktamlara direnç fenotipi..... 32
2.9.2. Yapı-Fonksiyon İlişkileri..... 33
2.9.3. Omega halkası..... 34
2.9.4. CTX-M enzimlerinin evrimi: Ser167 ve Gly240 kalıntıları..... 34
2.10. ST131 Bakteriyel Özellikler..... 36
2.10.1. Filogenetik Grup ve Serotipler..... 36
2.10.2. ST131..... 36
2.10.2.1. Toksinler..... 39
2.10.2.2. Sideroforlarla demir kazanımı..... 39
2.10.3. *E coli* ST131 Klonunu tespiti için tarama yöntemleri..... 40
2.10.4. *E. coli* ST131 Genomiği..... 41
2.11. ST131 *E coli*'nin Antibiyotik direnci..... 42

2.11.1. Biyofilm üretimi ve metabolik potansiyel 42
2.12. *E coli* ST131 izolatlarının plazmid karakterizasyonu 43
2.13. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) 45
2.13.1. PCR Optimizasyonu 45
2.13.2. Real time PCR'ın temelleri 46
2.13.2.1. PCR Amplifikasyonu 46
2.13.2.2. PCR'ın gerçek zamanlı izlenmesi 46
2.13.2.3. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ve Üç Temel Basamağı 47
2.13.2.3.1. Denatürasyon 47
2.13.2.3.2. Primer eşleşmesi , Bağlanma (Annealing, hibridizasyon) 47
2.13.2.3.3. Primer uzaması, uzama (Elongation, Extension, polimerizasyon) 48
2.14. Yüksek çözünürlüklü erime sıcaklığı (Tm) veya erime eğrisi analizi 48
3. MATERYAL ve METOD 49
3.1. Mikrobiyolojik ve Moleküler Yöntemler 49
3.2. Antimikrobiyal Duyarlılık testi ve Geniş Spektrumlu β-laktamaz (GSBL) 50
3.2.1. VİTEK 2 COMPACT 50
3.2.2. Çift Disk Sinerji Yöntemi 50
3.3. DNA İzolasyonu 51
3.3.1. CTX-M β-Laktamaz Genleri ve ST131 Klonunun Araştırılması 51
3.3.2. Örnek lizisi ve DNA bağlanması 52
3.3.3. Nükleik asit kantitasyonu 53
3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 54
3.3.5. PCR Amplifikasyonu 54
3.3.5.1. BlaCTX-M-3 ve blaCTX-M-15 genin PCR Amplifikasyonu 54
3.3.5.2. Master mix hazırlanması 55
3.3.5.3. Isı Döngü Proğramı 55
3.3.5.4. ST131 Klonunun tespiti için primerler 57
3.3.5.5. ST131 *E. coli* klonu 59
3.4. İstatistiksel Analiz 60

4. BULGULAR 61
5. TARTIŞMA 78
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 86
KAYNAKLAR 89
ÖZGEÇMİŞ 99

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa No:
Şekil 2.1.	Konakçı doku ile etkileşimdeki *E. coli* hücesinin şeması	5
Şekil 2.2.	İdrar yolu enfeksiyonunda P fimbrialar	6
Şekil 2.3.	Hücre Duvarı Antijeni Lipopolisakkaritin Yapısı	9
Şekil 2.4.	β-laktamazın moleküler yapısı.	15
Şekil 2.5.	Bir oksiimino-aminotiyazolil sefalosporinin yapısı	21
Şekil 2.6.	TEM GSBL türevlerinde amino asit ikameleri	22
Şekil 2.7.	*E. coli*'de CTX-M Enzimlerinin Filogenetik Dağılımı	27
Şekil 2.8.	CTX-M Gruplarının Dağılımı	28
Şekil 2.9.	CTX-M enzimlerin substrat spektrumunun nokta mutasyonları ile modülasyonu	35
Şekil 2.10.	*E. coli* ST131'in H30 alt klonlarının ve diğer alt klonlarının popülasyon yapısı	37
Şekil 2.11.	*E. coli* kromozomu etrafına dağılmış 7 housekeeping genlerinin fragmanları	40
Şekil 2.12.	ST131 izolatlarından iki IncF plazmidi pEK958 ve pEK499'un sekans karşılaştırılması	44
Şekil 2.13.	PCR sıcaklık döngüsü	46
Şekil 2.14.	Bir Threshold (eşik) seviyesi, arkaplanın yeterince üzerinde ayarlanmış ve eşiğe (threshold) ulaşmak için gereken döngü sayısı (CT) gösterimi.	47
Şekil 2.15.	Real Şekil: Real time PCR'ın şematik diyagramı	48
Şekil 3.1.	Spin kolon temelli DNA izolasyonu	53
Şekil 3.2.	Real time PCR blaCTX-M-3 geninin erime eğrisi piki	56
Şekil 3.3.	Real time PCR blaCTX-M-15 geninin erime eğrisi piki	57
Şekil 3.4.	Real time PCR ST131 Klonun eğrime eğrisi piki	58
Şekil 3.5.	Real time PCR ST131 Timin 144 SNP erime eğrisi piki	58
Şekil 4.1.	Toplam *E. coli*'de GSBL oranı	62
Şekil 4.2.	GSBL pozitif 85 *E. coli* suşun izole edildiği bölümler	63
Şekil 4.3.	CTX-M-3 ve CTX-M-15 β-laktamaz pozitif *E.coli* suşlarını izole ettiğimiz hastaların kullandıkları antibiyotikler	77

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa No:
Tablo 2.1.	***E coli*** adezinlerinin böbrek, mesane ve idrar epitel hücrelerine bağlanması	7
Tablo 2.2.	**β**-laktamazların Sınıflandırılması	17
Tablo 2.3.	***E coli*** ST131 arasında virotipleri ayırt etmek için VF kodlayan gen şeması .	40
Tablo 3.1.	CTX-M 3 ve CTX-M-15 gen bölgesine ait primerler	54
Tablo 3.2.	**P**abB içinde ST131'e özgü hedef gen bölgelerine ait primerler	57
Tablo 3.3.	**S**T131 için Real-time amplifikasyon protokolü kullanıldı.	59
Tablo 4.1.	Çeşitli klinik izolatlarda *E. coli*'nin GSBL oranları	61
Tablo 4.2.	Vitek 2 Sisteminde Antibiyotiklerin Minimum İnhibitör Konsatrasyonu (MİK) değerleri	62
Tablo 4.3.	GSBL pozitif 85 *E.coli* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Oranları	64
Tablo 4.4.	GSBL negatif 85 *E. coli* suşunun antibiyotik direnç oranları	65
Tablo 4.5.	GSBL pozitif ve negatif 85 *E. coli* suşunun antibiyotik duyarlılıklarında P değerleri	66
Tablo 4.6.	***E. coli*** CTX-M-15 pozitif suşların antibiyotik direnç oranları	67
Tablo 4.7.	***E. coli*** CTX-M-3 pozitif suşların antibiyotik direnç oranları	68
Tablo 4.8.	CTX-M-3 ve CTX-M-15 pozitif izolatların antibiyotik duyarlılıklarının P değerleri	69
Tablo 4.9.	CTX-M-3 veya CTX-M-15 pozitif *E. coli* suşlarının direnç oranları	70
Tablo 4.10.	CTX-3 ve CTX-M-15 negatif GSBL Pozitif 26 *E. coli* Suşları	71
Tablo 4.11.	CTX-M-3 ve CTX-M-15 pozitif 59 suş ile CTX-M-3 ve CTX-M-15 negatif 26 suşun antibiyotik duyarlılıkları	72
Tablo 4.12.	ST131 pozitif *E. coli* Antibiyotik direnç oranları	73
Tablo 4.13.	ST131 negatif *Ecoli* suşlarının Antibiyotik Direnç Oranları	74
Tablo 4.14.	ST131 pozitif ve negatif *E. coli*'lerin izole edildiği hastalarda kullanılan antibiyotikler	75
Tablo 4.15.	CTX-M-3 ve CTX-M-15 β-laktamazlara sahip hastaların klinik değerlendirilmesinde risk faktörleri	76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

GSBL **:** Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz

MDR **:** Çoklu ilaç direnci

CLSI **:** Clinical Laboratory Standards Institute

CTX-M **:** Sefotaksimi hidroliz eden β-laktamaz tipi

ST131 **:** Sekans tipi 131 olan klon

ExPEC **:** Ekstraintestinal patojenik *E. coli*

UPEC **:** Uropatojenik *E. coli*

İYE **:** İdrar yolu enfeksiyonu

UPEC **:** Uropatojenik *E. coli*

PCR **:** Polimerz zincir reaksiyonu

MLST **:** Multilocus Sequence Typing

EaggEC **:** *Enteroagregativ E. coli*

EDTA **:** Ethylenediaminetetraacetic acid

EHEC **:** *Enterohemorrhagic E. coli*

EIEC **:** *Enteroinvasive E. coli*

EPEC **:** *Enteropatojenik E. coli*

ETEC **:** *Enterotoksijenik E. coli*

PFGE **:** Pulsed Field Gel Electrophoresis

MLST **:** Multilocus Sequence Typing

MİK **:** Minimal İnhibitör Konsantrasyonu

IMVIC **:** Indol, Metil Kırmızısı, Voges Proskauer ve Sitrat

LPS **:** Lipopolisakkarit

MHB **:** Müller Hinton Besiyeri

PBS **:** Fosfat Tamponlu Salin

ÇDST **:** Çift Disk Sinerji Testi

RFLP **:** Restriction Fragment Lenght Polymorphism

ADT **:** Antimikrobiyal duyarlılık testi

CFU **:** Colony Forming Unit

ÖZET

Escherichia coli'nin 025b-ST131 Klonunun ve CTX-M-15 benzeri Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazın PCR ile belirlenmesi

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) _Enterobacteriaceae_'de sık görülmektedir. Özellikle _E.coli_ serotip O25b: H4, filogenetik grup B2 ve sekans tipi 131 (ST131) GSBL tipi CTX-M-15 ile karakterize edilen küresel olarak yayılan uluslararası bir klon grubu çoklu ilaç direnciyle (MDR) gelişen enfeksiyonların tedavisini de güçleştirmektedir.

Çalışmamızda 17.4.2019-21.7.2019 tarihleri arasında çeşitli servis ve poliklinik hastalarından alınan idrar örneklerinin GSBL pozitif 85 _E. coli_ izolatının ST131 klonu ve blaCTX-M-15 β-laktamaz geninin prevalansı ayrıca antibiyotik duyarlılık durumunun belirlemesi amaçlandı. Bakterinin tanımlanması, GSBL varlığı ve antibiyotik duyarlılıkları VITEK2 otomatize sistemiyle (bioMérieux, Fransa) tanımlandı. Duyarlılık sonuçları EUCAST kriterleri esas alınarak belirlendi. GSBL üretimi çift disk sinerji testiyle doğrulandı. Ardından GSBL kodlayan blaCTX-M-15 ve blaCTX-M-3 genler Real time PCR ile analiz edildi. Toplam 85 GSBL pozitif _E coli_ izolatının 59'u (%69.4) bla CTX-M genleri için pozitifti, bunun 25(%29.4)'inde CTX-M-15, 34(% 40)'ünde CTX-M-3 pozitif olup, 26(%30.5)'sında CTX-M-3 ve CTX-M-15 β-laktamaza sahip değildi.

CTX-M-3 ve CTX-M-15 pozitif 59(%69.4) suşlar için en hassas (%100) karbapenem (ertapenem ve imipenem) ve en dirençli (%100) ampisilin ile sefalosporin grubu antibiyotiklerdi.

GSBL pozitif 85 _E. coli_ suşunun 23(%27.1)'ünde Real time PCR ile ST131 klonunu tespit ettik, 62(%72.9)'si ise negatifti. Bu grupta da en hassas antibiyotikler %100 karbapenem (imipenem ve ertapenem) olup en dirençliler ise (%100) sefalosporinler (sefiksim, seftazidim, seftriakson, sefuroksim), ampisilin ve AMC idi.

Anahtar Kelimeler: CTX-M enzim türleri, _Escherichia coli_, ExPEC, Polimeraz zincir reaksiyonu, ST131,

ABSTRACT

Detection of Escherichia coli clone O25b-ST131 and Expended Spectrum Beta Lactamase like CTX-M by PCR

Extended spectrum beta lactamases (GSBL)are common in *Enterobacteriaceae*, especially *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. a globally spreading international clone group multidrug resistance (MDR) especially characterized by *E. coli* serotype O25b:H4, phylogenetic group B2 and sequence type 131 (ST131)GSBL type CTX-M-15, making it difficult also provides the fluoroquinolone and aminoglycoside resistance infections developed multidrug

In our study, it was aimed to determine the prevalence of ESBL positive 85 *E. coli* isolate ST131 clone and blaCTX-M-15 β-lactamase gene, as well as the antibiotic susceptibility status of urine samples taken from various service and outpatient clinic patients between 17.4.2019 and 21.7.2019. Bacterial identification, presence of ESBL and antibiotic susceptibility were defined with the VITEK2 automated system (bioMérieux, France). Sensitivity results were determined based on EUCAST criteria. ESBL production verified by double disc synergy test. Then, blaCTX-M-15 and blaCTX-M-3 genes encoding ESBL were analyzed by Real time PCR. Of a total of 85 ESBL positive E coli isolates, 59 (69.4%) were positive for the bla CTX-M genes, of which 25 (29.4%) were positive for CTX-M-15 and 34 (40%) were positive for CTX-M-3. , 26 (30.5%) of CTX-M-3 and CTX-M-15 did not have β-lactamase.

For CTX-M-3 and CTX-M-15 positive 59 (69.4%) strains, the most sensitive (100%) carbapenem (ertapenem and imipenem) and the most resistant (100%) ampicillin and cephalosporin antibiotics were antibiotics.

We detected ST131 clone by Real time PCR in 23 (27.1%) of 85 ESBL positive *E. coli* strains, while 62 (72.9%) were negative. In this group, the most sensitive antibiotics were 100% carbapenem (imipenem and ertapenem), while the most resistant (100%) were cephalosporins (cefixime, ceftazidime, ceftriaxone, cefuroxime), ampicillin and AMC.

Key Words: **CTX-M enzyme types, *Escherichia coli*, ExPEC, Polimerase chain reaction, ST131,**

1. GİRİŞ

Genişlemiş spektrumlu β-laktamaz (GSBL) üreten mikroorganizmalar, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerinde (CDC) ciddi ve artan tehdit olarak gösterilir. ABD'de 26.000 ilaca direçli enfeksiyondan ve yılda yaklaşık 1700 ölümden sorumludur. Antibiyotik Direnci Tehdit Raporuna göre (CDC, 2019) hastanede yatan hastalar arasında idrar yolu enfeksiyonu (İYE) %11.6 ve kan dolaşımı enfeksiyonunun %16.1'inden sorumlu GSBL üreten *Escherichia coli* (*E.coli*) olabilmektedir.[1-2]

E. coli normal bağırsak bakterisi aynı zamanda enfeksiyonlara neden olan önemli fırsatçı patojendir ve insanda İYE, menenjit, bakteremi, gastrointestinal enfeksiyonların ortak nedenidir. *E. coli* tedavisinde antimikrobiyal ajanlar arasında β-laktamlar, florokinolonlar ve aminoglikozitler bulunur.[1] İYE her yıl milyonlarca insanı etkileyen en yaygın bakteriyel enfeksiyonlar arasındadır. *E. coli*, hastane ya da toplum kaynaklı, İYE'nin en önemli nedenidir.[2] Dünyada yaklaşık 150 milyon İYE vakası (Kadınların% 50'si ve erkeklerin % 12'si ve etkilenen kadınların yaklaşık % 25'i tekrarlayan İYE)olduğu düşünülmektedir.[3] Antibiyotik direncinin ortaya çıkması, giderek endişe verici bir halk sağlığı tehdidi haline gelmiştir.[4] Genellikle mikroorganizmanın pandemi seviyesinde dağılımı, yüksek virülans gibi faktörlere bağlanabilir.[5] Gram-negatif çok ilaca dirençli (MDR) bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar dünya çapında bir sağlık sorunudur.[6] Gram negatif bakterilerde, kromozomlar, plazmidler ya da transpozonlar aracılığı ile sentezlenen beta-laktamazlar; β-laktam antibiyotiklerdeki amid bağlarını parçalayan enzimlerdir.[7]

TEM ve SHV 1990'ların sonuna kadar baskın GSBL tipleriyken son on yılda CTX-M enzimleri dünya çapında yayılmıştır.[8] CTX-M grubu β-laktamazlar substrat olarak sefotaksimi tercih eden, seftazidimi de bir miktar hidroliz eden enzimlerdir.[9].Ayrıca önemli bir özelliği de CTX-M enzimlerine karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulanik asit ve sulbaktama göre fazla olmasıdır. *E. coli* dirençle ilgili mekanizmaların araştırılmasına neden olmuş GSBL üretiminin ana mekanizması ve GSBL'ler arasında CTX tip M varyantları diğerlerinden daha yaygın olduğu bulunmuştur. [10]

CTX-M enzimleri sefotaksime direnç sağlama fakat seftazidime direnç gösterme yetenekleriyle karakterize edilir. CTX-M-15, CTX-M tipi enzimlerin çoğunun aksine

seftazidime direnç sağlar ve dünyanın birçok yerinde baskın CTX-M genotipidir.[11] *E. coli* GSBL üreten izolatların çok dirençli klonal grubu O25b: H4 / ST131, 2008 yılında CTX-M-15 ile bağlantılı büyük bir klondur.[11, 12]

E. coli ST131klonu, hem toplumda hem de klinik ortamlarda idrar yolu ve kan dolaşımı enfeksiyonları ile dünya çapında yayılımdan sorumludur.[10] 2008 yılında üç kıtada tanımlanmıştır. Günümüzde ST131, dünya çapında ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) izolatları arasında baskın *E.coli* soyudur. ST131 izolatlarının yaygın olarak CTX-M-15 gibi GSBL ürettikleri ve hemen hemen hepsinin florokinolonlara karşı dirençli olduğu görülmüştür.[2] Toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedeni olup ilk sıra ve son çare antibiyotiklere karşı direnç ile tedavisi çok zorlaşmıştır.[11] Son yıllarda, *Enterobacteriacea*'de özellikle *E.coli* MDR enfeksiyonlarına neden olan uluslararası O25b: H4-B2-ST131 klon grubu küresel olarak yayıldı.[12] Özellikle üropatojenik GSBLgenlerini kodlayan O25b-ST131 *E. coli* klonun yayılması endişe vericidir.[13] İnsan hastalığı ile en sık ilişkili olan üropatojenik *E. coli* (UPEC) dahil olmak üzere ExPEC, farklı virülans gen kümelerine sahip farklı filogenetik gruplardan oluşur önceki çalışmalar ile ExPEC izolatlarının çoğu enfeksiyona neden olan filogenetik grup B2 ve D'ye ait olduğu, filogenetik grup A ve B1 izolatlarının çoğunlukla kommensal intestinal *E. coli* izolatları olduğu tespit edilmiştir. Filogenetik grup ve virülans faktörlerine göre farklılık gösterirler.[14] ExPEC patojenitesi; virülans faktörlerini kodlayan bakteriyofaj, plazmidler veya kromozomlar üzerinde bulunan genlerin varlığından kaynaklanır. Kromozom üzerinde bulunduğunda, bu genler tipik olarak patojenite adaları (PAI) olarak adlandırılan belirli bölgelerde bulunur.[15] Patojenik ExPEC, spesifik virülans genleri barındırır.[16] Serogrup 025:H4-ST131 klonu, ExPEC ile ilişkili son derece virülent filogenetik grup B2'ye aittir. ST131 izolatlarının, ST131 olmayanlarla karşılaştırıldığında daha geniş virülans ile direnç genlerine sahip olması yayılımda önemli rol oynayacağı bildirilmiştir.[17] Bu klonun tüm ExPEC enfeksiyonlarının yaklaşık %20' sinden sorumlu olduğu düşünülmektedir.[18]

Bu çalışmada amaç idrar ve kan izolatlarında hastane ve toplum kökenli *E. coli* izolatlarının O25b-ST131klonu ile CTX-M-3 ve CTX -M-15 GSBL varlığını Real Time PCR aracılığıyla tanımlamak ve prevalasını ortaya çıkarmak, ST131 ve ST131 olmayan izolatların antimikrobiyal dirençliliklerinin karşılaştırılması ayrıca klinik *E. coli* izolatlarında yüksek riskli ST131 klonunun prevalansını araştırmaktır.

Hastanemizde CTX-M β-laktamazının ve ST131 klonunun kan dolaşımına ve İYE'ye bağlı enfeksiyonların önemli nedenleri olarak ortaya çıkıp çıkmadığını belirlemek için izolatları karakterize ettik.

Escherichia coli ST131, toplum ve hastane kaynaklı bağırsak dışı enfeksiyonlarla ilişkili, global çok ilaca dirençli klonun patogenezinin ve klinik etkisinin daha fazla anlaşılması gerekmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Escherichia Coli*

E. coli, bağırsak ve dışkıda en çok bulunan fakültatif anaerop yaşayan, ancak su ve besinlerin dışkı ile kontaminasyonuyla doğada bulunur. Yenidoğan sindirim sisteminde ilk saatlerden itibaren kolonize olarak mutualist yaşamaktadır.[19, 20]

E. coli, 2-6 μm boyunda, 1-1,5 μm çapında, Gram negatif, sporsuz, basil, Peritiriş kirpikleri (flagella) ile hareketlidirler.[21]

Basit besiyerlerinde 18-24 saatte 3-4 mm çapında S tipi koloni, kapsüllü olanlar ise M tipi koloni yaparlar. Seyrek olarak kapsül oluşturmaktadır. Çoğu izolat polisakkarit yapıda M ve K antijeni içeren mikrokapsüle sahiptir Kanlı agarda bazı izolatları β- hemoliz yapabilir. Eosin Methylene Blue agarda (EMB) koloniler metalik röfle, MacConkey ve SalmonellaShigella (SS) agarda, safra tuzlarının oluşturduğu pembe alanlarla etrafında zonla çevrili laktoz pozitif koloniler oluşur. *E. coli* türlerinin %90'ı laktoz pozitiftir *Enteroinvaziv E. coli* (EIEC) ise laktoz negatiftir. Cysteine Lactose Electrolyte Deficient (CLED) agar ve Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agarda sarı koloniler meydana getirirler.[19]

Optimal üreme ısısı 37°C, PH'sı 7-7,2 ve 20 dakikada bölünme yeteneğine sahiptirler. Katalaz, indol metil kırmızısı testleri, lizin dekarboksilaz reaksiyonu pozitif, oksidaz, fenilalanin deaminaz, lipaz, negatiftir. Çoğunlukla indol pozitif, üreaz negatiftirler, potasyum siyanid testi (KCN) negatiftir. Asetatı tek karbon kaynağı olarak kullanır. Simon'un sitratlı besiyerinde üremez (İMVİC testi +,+,-,-).[21, 22]

2.1.1. Antijenik yapı ve tiplendirilmesi

Kaufmann (1944) yüzey antijenine göre sınıflandırmada *E. coli* basili O antijenine göre gruplara H ve K antijenine göre serovarlara ayrılır.

O (somatik) antijeni: lipopolisakkarit yapılı ısı ve alkole dirençli *E. coli*'nin 170'den fazla O serogrubu vardır.

H (flagella) antijeni: protein yapıda, hareketli suşlarda bulunur. Isı ve alkole duyarlıdır. Yaklaşık 60 H antijeni vardır.

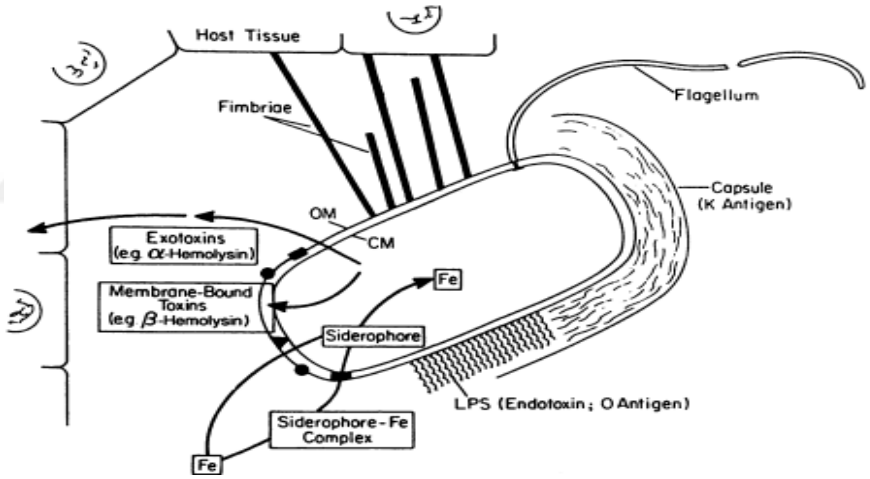
K (kapsül) antijeni: Virülansta rol oynar. Bazı *E. coli*'ler de bulunur. Polisakkarit yapıdadır ve 80 çeşidi saptanmıştır.

K 1, 2, 3, 5, 12 ve 13 antijenlerini içeren suşlar büyük oranda piyelonefrit etkenidir. K1 en sık (%80) saptanan antijendir olup yeni doğanlarda sistemik enfeksiyona yol açar.

Fimbrial antijenler: Pili olarak da bilinir. Protein yapılı, O aglütinasyonunu engelleyen oda sıcaklığında değil de 37°C'deki aderenste rol oynayan antijendir. Kromozom aracılı genel fimbria ve konjugatif plazmidlerle kodlanan seks pilisi iki alt gruba ayrılır. Genel fimbria konak hücre yüzeyine bağlanmada, seks veya konjugasyon pilisi bakteriler arasında genetik materyalin transferinde rol oynar.

Antijenler tek başına virülansı göstermezler ancak spesifik virülan klonlarla ilişkili kromozomal göstergelerdir.[19]

2.2. Yüzey virülans faktörleri (Virotyping)



Membran proteinleri (Taşıma, serum direnci vs.), içi dolu siyah daireler, üçgenler ve dikdörtgenler ile gösterilir. OM, Dış zar; CM, sitoplazmik membran; LPS, lipopolisakkarit.[23]

Şekil 2.1. Konakçı doku ile etkileşimdeki *E. coli* hücesinin şeması

Antivirulans faktörler epitel hücrelerinde koloni oluşturarak canlının savunma mekanizmalarını yok ederek istila ederler.

Konakçı ve bakteriyel hücre sinyal yollarını doğrudan tetikleme, diğer bakteriyel ürünlerin konak dokulara verilmesini kolaylaştırma, bakteri istilasını teşvik etme şeklinde adezinlerin virülansa farklı şekillerde katkıları bulunur.

İdrar yolunda konağa bağlanmayı sağlayan farklı tipte fimbrialar vardır. Murin İYE modelinde**, tip 1 fimbriaların** bakteriyel hayatta kalmayı arttırdığı, mukozal inflamasyonu uyardığı, biyofilmle istila ve büyümeyi teşvik ettiği görülmüştür.

Fimbriaların ucundaki adhezin alt birimi **fimH**, ürotelyal hücrelerin adhezyon, invazyon ve apoptozunda rol oynar ve üroplakin reseptör kompleksine bağlanarak mesane patolojisini başlatır.[24-26]

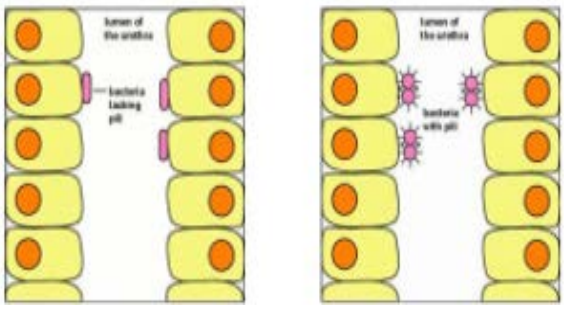
2.2.1. Mannoz Duyarlı Fimbria

2.2.1.1. Tip 1 Fimbria

Tip 1 fimbria tüm *Enterobacteriaceae'*deki bakterilerin ince, sert, tutunma organelleridir. Tutunma özelligini *fim*H adezinler sağlar. *Fim*H adezin idrar yolu sistemi yüzeyi ve memelideki mannoz içeren glikoproteinleri tanır. Üroepitelde kolonizasyonunu sağlar.[27]

P fimbrialar, insanda İYE ve piyelonefritin patogenezinde ikinci yaygın virülans faktördür. Mukozal ve doku matriksine adhezin ve sitokin üretiminden sorumludur. Renal epitelde böbrek glikosfingolipidlerini tanır ve bu reseptöre bağlanarak immün hücre yanıtının aktivasyonundaki Toll benzeri reseptör 4'ün (TLR4) agonisti seramid salımı ile ilişkili lokal inflamasyon ve ağrıya sebep olur.[28, 29]

Bakteri kolonizasyonunu kolaylaştıran iki fimbria sinerjistik çalışırlar. P fimbria, tübüler epitelyumu erken kolonizasyonu arttırırken tip 1 fimbria, bakteriler arası bağlanma ve biyofilm oluşumunu içeren mekanizma ile tübül merkezininin kolonizasyonu ile nefronun tamamen tıkanmasını sağlar.[30]



Şekil 2.2. İdrar yolu enfeksiyonunda P fimbrialar

P fimbria (pyelonefrit ile ilişkili pili [PAP],

P fimbria P kan grubu antijenlerine bağlanır.

S fimbria ve F1C fimbria: Alt idrar yolu ve böbrekte epitel ve endotel hücrelere bağlanarak konakçı dokuda bakteriyel yayılmayı kolaylaştırıp İYE'de rol oynar.

Tablo 2.1. *E coli* adezinlerinin böbrek, mesane ve idrar epitel hücrelerine bağlanması [31]

Böbrek	**S fimbria**	**P fimbria**	**Tip1 fimbria**
Bowman kapsülü	**+++**	**+++**	**-**
Glomerulus	**+++**	**+++**	**-**
Proksimal tüp	**++**	**++**	**+++**
Distal tüp	**++**	**++**	**+**
Toplayıcı kanal	**++**	**+**	**+**
Damar duvarı	**+++**	**+++**	**+++**
Mesane			
Epitel	**++**	**+**	**-**
Damar duvarı	**+++**	**+++**	**++**
Kas tabakası	**+**	**+**	**+++**
Bağlayıcı doku	**++**	**-**	**-**
İdrar			
Epitel hücreleri	**+**	**+**	**-**

Sembol; -, +,++,+++ sırasıyla saptanamadı, zayıf, orta, güçlü bağlanma

K1 ve K5 kapsüller Bakterideki polisakkarit yapılı kapsül konakta fagositoza ve komplement aracılı bakterisidal etkiye karşı koruma sağlar. Doku bileşenlerine moleküler taklit ile konağın immün tepkisini önler.[25, 31]

Hücre duvarının ayrılmaz bileşeni lipopolisakkaritler (LPS), konakçı tepkisini aktive ederek nitrik oksit ve sitokin üretimini indüklemektedir.

Flagella, renal toplama kanalı hücrelerini istila eder ve invazin gibi davranır. Bakterilerin mesaneden çıkmasına ve böbrek enfeksiyonuna sebep olur.[32]

Piyelonefrit gibi üst İYE'ler ile ilişkili **α-hemolizin (HlyA)** adlı lipoprotein UPEC'den salgılanan virülans faktörüdür. HlyA, RTX (toksinde tekrarlar) toksinleri ailesine ait olan gözenek oluşturan bir toksindir. Böbrek epitel hücrelerinde Ca^{+2} salınımını indükleyerek IL-6 ve IL-8 üretiminin artmasına neden olmaktadır. Renal

proksimal tübüllerdeki birincil epitel hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda eritrositleri ve çekirdekli hücreleri parçalayarak bağırsak dışı mukozal bariyerleri daha iyi çaprazlamasına, efektör bağışıklık hücrelerine zarar vermesine, konakçı besinlere ve demir depolarına erişmesini sağlar. HlyA'nın düşük konsantrasyonu, nötrofil, T lenfosit ve böbrek hücreleri dahil apopitozu indükleme ve mesane hücrelerinin pul şeklinde dökülmesini sağlar.

Sitotoksik nekrotizan faktör 1(CNF1), 115 Kd'lık toksin olup, *E. coli*'nin böbrek invazyonunda ve morfolojisinin bozulmasında hücre siklusunun durdurulmasında, hücre lizisinde rol oynayabilir. İn vitro çalışmalar CNF1'in polimorfonükleer fagositoza müdahale ettiğini ve mesane epitel hücrelerinin apoptotik ölümünü göstermiştir. In vivo, CNF1 mesane hücresi pul şeklinde dökülmesi alttaki dokuya bakteriyel erişimi sağlar.

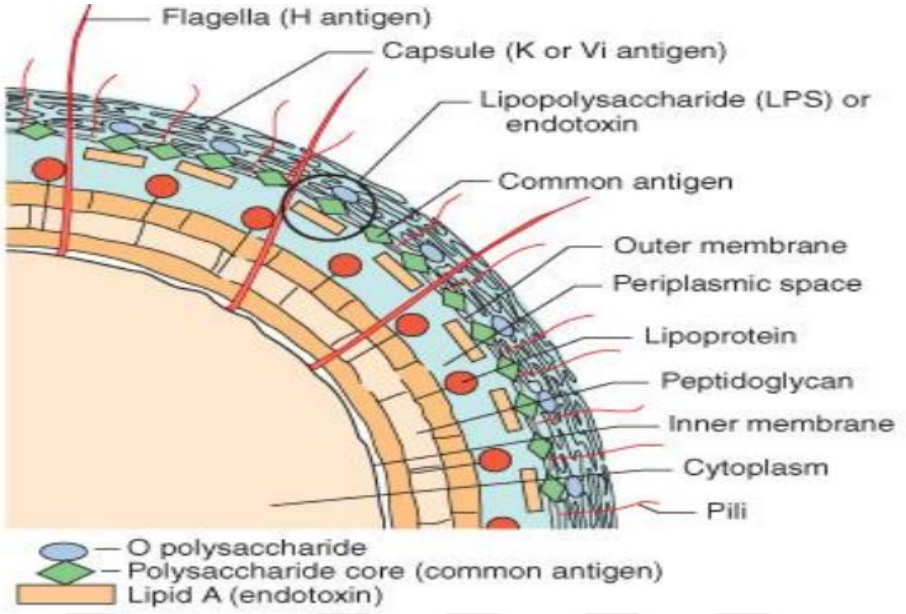
Salgılanan ototransporter toksini (SAT), mesane, böbrek hücrelerine karşı toksik aktiviteye sahiptir.

2.3. Patogenez ve İmmünite

2.3.1. Virülans faktörleri

2.3.1.1. Endotoksin

Hücre duvarı antijeni lipopolisakkaritin (LPS) en içteki lipid A bileşeni endotoksinden sorumlu olup hücre ölümünü gerçekleştirir. Kompleman ve sitokin salınımı endotoksin tarafından aktive edilerek enfeksiyonun sistemik bulgusu gelişir (lökositoz, trombositopeni, damar içi koagülasyon, ateş, periferik dolaşımda azalma, şok ve ölüm).



Şekil 2.3. Hücre Duvarı Antijeni Lipopolisakkaritin Yapısı

2.3.1.2. Kapsül

Kapsül antijeni antikorun bakteriye bağlanmasını önler; zayıf immünojen ise komplemanı iyi aktive etmez. Hidrofilik kapsül antijenler fagositik hücrelerin fagositozundan kaçışı sağlar.

Bakteri hücre yüzeyinde hidrofilik ve negatif yüklü özellik oluşturarak opsonizasyon ve fagositoza engel olur. Ayrıca alternatif kompleman yolunu inhibe ederek kompleman sisteminin bakterisidal etkisini ortadan kaldırır.

2.3.1.3. Antijenik Faz Varyasyonu (antijenik değişim)

Somatik O, kapsüler K ve flagellar H antijeninin ekpresyonu bakterinin genetik kontrolünde olup, bu antijenlerin her biri farklı şekillerde ekprese edilebilir veya edilmeyebilir (faz varyasyonu). Bakteriyi antikor aracılı hücre öldürme mekanizmasından korur.

2.3.1.4. Tip III Sekresyon Sistemleri

Virülans faktörlerin hedef ökaryot hücreye geçişi sağlayan efektör sistemdir. Yaklaşık 20 proteinden oluşur. Tip III sekresyon yokluğunda bakterinin virülansı azalır.

2.3.1.5. Çoğalma faktörlerinin temini

Tüm canlı hücrelerin demire ihtiyacı olup *E. coli* oksijen taşınması ve depolanması, DNA sentezi, elektron taşınması ve peroksitlerin metabolizmasında demiri kullanır**.**

Ayrıca önemli çoğalma faktörüdür. Demir hem proteinlerine (hemoglobin, miyoglobulin) ve demir bağlayan proteinlere (transferrin, laktoferrin) bağlıdır. *E. coli'*nin sideroforlar ve demir bağlayan bileşikleri (enterobaktin, aerobaktin) vardır. Bakteri hücre başına 10^1-10^6 demir atomu içerir. Konakçının enfeksiyona verdiği yanıt mevcut demir miktarını daha da azaltarak bir kısmı hücre içi depolamada plazma havuzundan demiri değiştirmek, ek demir proteinleri sentezleyerek bağırsak demir emilimini azaltarak patojeni istila etmesiyle bakteri demir ihtiyacında büyük zorluklarla karşılaşır. Enfeksiyon sırasında hidroksamat siderofor aerobaktin *E. coli'*de ve birkaç enterik bakterinin demir alımında kullandığı sistem olup demir şelasyonunun en etkilisidir.

Aerobaktin iki lizin ve bir sitratın molekülünden oluşmuş küçük moleküldür. *E. coli* hücrelerinden salgılanan aerobaktin konağın demir bağlayan proteinlerinden Fe^{+3}'ü 74 kDa'lık dış membran reseptör proteininden çıkarır. Aerobaktinli suşlar serum ve seyreltik idrar dahil düşük demirli koşullarda adaptasyonu sağlar. *E. coli* diğer sideroforların yokluğunda düşük demir koşullarında büyümeyi desteklemek için yeterli sitrat taşıyamaz ve ferrikrom kullanabilir ancak sentezleyemez. Aerobaktin sisteminin diğer sideroforlardan birçok avantajı vardır**.**

Enterobactin, aerobactin, yersinabactin, sitrat ve heme gibi şelat bileşikleri tarafından Ferrik demiri *E. coli*' ye sunarak ferrik demir alımını yükseltir. Şelatlayıcılar ATP bağlayıcı transport sistemlerince sitoplazmik zara giren dış zar boyunca uzanan demiri alan spesifik dış zar proteininden oluşur.[33]

2.3.1.6. Serumun öldürücü etkisine direnç

Pyelonefrit *E.coli* suşları serumun öldürücü etkisine dirençlidir.[34]

Kapsül ve diğer faktörler kompleman komponentinin bakteri yüzeyine bağlanmasını önler. Kompleman aracılı öldürmeden korur.[35] Murein lipoprotein Lpp ve iki lipidA çekirdek biyosentez enzimi (WaaP ve WaaG) en güçlü şekilde serum direnciyle ilişkilidir.[10] Virülan Faktörlerin çoğu patojenite adalarında (PAI) kodlanır.

PAI'lar, *E. coli*' nin virulansa bağlı genleri barındıran, ayrı bir G + C içeriğine sahip kromozomal eklenmiş genetik elementler olarak tanımlanır. PAI'ler yatay gen transferi yoluyla kazanılır.[31, 36, 37]

Patojenite adalarında birkaç virülans kaseti patojenik organizmaların kromozomuna eşlenmiştir. Belirli bir uzunlukta çoğu zaman belirli bir virülans fenotipine katkıda bulunan büyük gen kümelerini barındırır. Bir patojenite adasının dahil edilmesi, normal iyi huylu bir organizmayı bir patojene dönüştürebilir. *E. coli*'nin üropatojenik suşunda patojenite adası PAI-1 tanımlanmıştır. PAI-1 70 kb uzunlukta ve bir hemolizin kodlar. Enterosit silinme lokusu LEE 35 kb bölge, konakçı hücreler ile teması teşvik eden dış membran proteini ve konakçı hücre fonksiyonlarını değiştirdiği bilinen proteinleri ihraç eden tip III salgılama sistemini kodlar. Bu sistem de virülans proteinlerinin sekresyonundan sorumludur.

E. coli'de PAI-1 ve LEE dışında da patojenite adaları tanımlanmıştır. Bazı üropatojenik izolatlar birden fazla patojenite adası içerir. *E. coli* 536 suşu PAI-1'e ek olarak, alternatif bir hemolizin ve Prf tipi fimbria için 190 kb gen içeren PAI-2 patojenite adasını barındırır. *E. coli'* de diğer patojenite adaları da hemolizin genleri içerir, ancak farklı tRNA lokuslarıyla ilişkilidir: pheV lokusundaki ada P- fimbria için genler içermektedir.

2.3.2. Antimikrobiyal Direnç

Antibiyotiklere karşı direnç plazmidler tarafından kodlanır. *E. coli,* simbiyoz iken genlerinin kaybı ve kazanımıyla özellikle sefalosporinlere direnci dünya çapında artışı neden olmuştur. GSBL üretimi ana mekanizma olduğu anlaşılınca bu dirençle ilgili mekanizmaların araştırılmasına yönelinmiştir.[38] *E. coli* izolatları konağa iyi adapte olmuş patojen haline gelmiştir. Bir kısmı diyareye neden olurken, bir kısmı ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olmaktadır.[38, 39] ExPEC izolatları, dünya çapında memeli ekstraintestinal enfeksiyonların çoğundan sorumludur.

E. coli ST131, esas olarak memelilerin sindirim sisteminde bulunur, ancak patojenitesi başka yerlerde, çoğunlukla idrar yollarına ve sıklıkla kan dolaşımı enfeksiyonlarına kadar ilerler klinik olarak ekstra-intestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) olarak sınıflandırılır.[40] İlk olarak 2008'de tanımlanmış, filogenik grubu B2'ye ait olup serotipleri O25b: H4ve O16: H5'tir.[5]

ST131, 2000 yılından itibaren tüm coğrafi bölgeleri kapsayan en yaygın ST olmuştur.[40] Bu izolatlar, virülans faktörlerine göre UPEC, invaziv enfeksiyonda spesifik özellikler (serumda hayatta kalma yeteneği, etkin demir alım mekanizmaları ve konakçı tarafından içselleştirilme) ile commensal *E. coli* izolatlarından farklıdır.[13]

ExPEC ST131 çoklu dirençli enfeksiyonların %80-90'ının sebebi olup çoklu antibiyotik sınıflara artan direnç genellikle GSBL CTX-M tipi ile birlikte florokinolon ve aminoglikozit direnci taşırlar.[41] Özellikle, toplum kaynaklı edinilen *E. coli* enfeksiyonlarında yaygın kullanılan florokinolon ve trimetoprim-sülfametoksazol ve geniş spektrumlu sefalosporin direnci hastanede tedavi seçeneklerini sınırlamaktadır. Tedavideki gecikme, yüksek maliyet ve "son çare" antimikrobiyallerin (karbapenemler) kullanılmasına neden olacaktır.[42] MLST'ye göre sekans tipi ST131 olarak adlandırılan, virülan *E. coli* 'nin klasik grup B2 ExPEC izolatlarından farklı olarak, CTX-M-15 gibi GSBL'ler ürettikleri genellikle de florokinolon direncine sahip olduğu görülmüştür.[2] Yüksek virülans ve metabolik yeteneklerin yanı sıra daha geniş antibiyotik sınıflarına karşı direnç bu özel soyun yaygın oluşunu ve kalıcılığını gösterebilir.[11] Ayrıca *E. coli* ST131 klonu gıda, yaban hayatı, kuş, primat, amfibi gibi hayvanlar ve toprak plaj suyu ve atık su gibi çevresel kaynaklardan da izole edilmiştir.[43]

2.3.2.1. Antimikrobiyal direncin genetik temelleri

Patojenler arasında direncin ortaya çıkması, dünya çapında bir halk sağlığı tehdidi olmuştur. Çoklu ilaca dirençli organizmaların toplumda da görülmesi antibiyotiğe dirençli bakteri rezervuarlarının hastane dışında da olduğunu göstermektedir. Bakteriler, antibiyotik moleküllerinin effluxu, nokta mutasyonları, yatay gen transferleri, lipid membran modifikasyonu ve antibiyotik dehidrasyon enzimlerinin sentezi gibi çeşitli mekanizmalarla direnç kazanabilir. Bakteriler antibiyotiğe uyum sağlamak için iki ana genetik strateji kullanır. Genelde bileşiğin etki mekanizması ile ilişkili genlerde mutasyonlar ve yatay gen transferi yoluyla dirençtir.

2.3.2.2. Mutasyon direnci

Duyarlı popülasyondaki bakteri, antibiyotik karşısında ilacın aktivitesini etkileyen genlerde mutasyonlar geliştirir ve dirençli mutant çıktığında ise duyarlı popülasyonu yok olur.

Bazı antibiyotiklerin hedefini kodlayan gen dizilerinin mutasyonları ile antibiyotik direnci sağlanır. Örneğin florokinolonlara direnç, hedefi kodlayan gendeki mutasyonlardan kaynaklanır (DNA-topoizomerazlar).

Antibiyotik alımının veya effluks sistemlerinin ekspresyonundaki değişiklikler de mutasyonla meydana gelebilir. *P. aeruginosa'*nın OprD porininin azaltılmış ekspresyonu veya yokluğu, hücre duvarının karbapenemlere geçirgenliğini azaltmaktadır.[44, 45]

2.3.2.3. Horizontal (yatay) gen transferi

Antibiyotik direncinin yayılmasının temel mekanizması, genetik materyalin yatay transferi olup üç ana mekanizması tanımlanmıştır. Antibiyotik direnç genleri, farklı **konjugasyon (bakteriyel sex**) ile mobil genetik elemanların bitişik iki bakteri arasında birleştirilmiş pili yapılarıyla transferi, **transformasyon (serbest DNA alımı)** veya **transdüksiyon (faj aracılı),** bakteriyofajla enfekte olmuş bakteriyle bakteriyofaja duyarlı bir bakteri arasında bakteriyel DNA'nın transferi ile gerçekleşebilir.

Son 15 yılda, karbapenemazlar hariç sefalosporinler ve β-laktamların çoğuna karşı geniş bir aktivite spektrumuna (GSBL) sahip β laktamaz enzimleri gelişmiştir., Başlangıçta *E. coli'*de daha sonra *Enterobacteriaceae*'nin diğer üyelerinde bulunan ve üropatojenik klon ST131 ile sıkça ilişkilendirilen, dünya çapında yayılan CTX-M-15 bu enzimlerden biri olmuştur. Genellikle oldukça hareketli IncFII plazmitlerinde bulunarak ve mobil genetik eleman IS26 ile ilişkili olduğu görülmüştür.

Hastane ortamında direncin ortaya çıkması genellikle hücreden hücreye teması içeren ve antibiyotik tedavisinde GİS'de yüksek oranda ortaya çıkacak çok etkili bir gen transferi yöntemi konjugasyonu içerir. Genetik bilgiyi paylaşmak için mobil genetik elementleri (MGE) kullanır. En önemli MGE'ler organizmalar arasında antimikrobiyal direncin gelişmesi ve yayılmasındaki rolleriyle plazmidler ve transpozonlardır.[46]

Antimikrobiyal direnç genlerinin biriktirmek için en etkili mekanizmalardan biri, mobil gen kasetleri biçiminde açık okuma çerçeveleri toplayabilen alana özgü rekombinasyon sistemleri olan integronlardır. Yeni genlerin bakteri kromozumuna eklenmesi için etkili mekanizmadır.[44] Uzun süreli hastanede kalma, kateterizasyon, önceki antibiyotik tedavisi, altta yatan hastalıklar, huzurevinde yaşama ve endemik bölgelere seyahat eden kişilerin enfeksiyon riskini yükseltmektedir.

2.3.3. β-laktam antibiyotikler

Penisilin bağlayıcı proteinler (PBP); Transpeptidaz, karboksipeptidaz veya glikoziltransferaz yapısında olup bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan üretiminde görev alırlar. β-laktam türü antibiyotikler bu moleküllere kovalan bağlarla bağlanarak peptidoglikan sentezini inhibe ederler ve bakteri üremesini engeller. β-laktam antibiyotikler yapılarında bir azot ve üç karbondan oluşan dört üyeli β-laktam halkası içerirler. Monobaktamlar hariç yapısına aldıkları ek halkalarla ayrılırlar (penisilinlerde thiazolidin halkası penisilin, sefalosporinlerde sefem çekirdeği, karbapenemlerde çift halka yapısı) β-laktamlar, outer membran protein (OMP) kanalcıklarından (porin) geçip, sitoplazmik membranla dış membran arasındaki periplazmik boşluktaki β-laktamazlardan etkilenmemeleri gerekmektedir.[47]

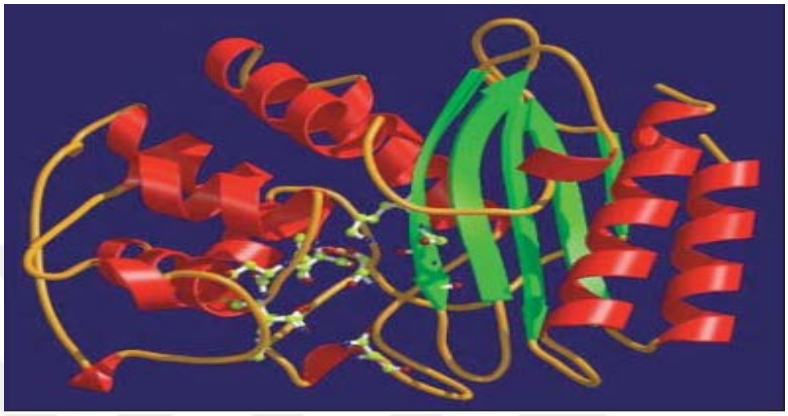
2.3.3.1. β-laktamazların Sentezi, Transferi ve Etki Mekanizması

β-laktamazlar büyük bir enzim ailesidir. Birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakteri tarafından üretilen, penisilinler, sefalosporinler ve benzeri β-laktam antibiyotiklerin beta-laktam halkasını hidroliz eden ve bu antibiyotikler de dirence sebep olan enzimlerdir. 1940 yılında *E. coli'*de penisilini parçalayan penisilinazın varlığı ile ilk kez gündeme gelmiştir. Gram pozitif bakterilerde dış zardan ekzoenzim ortama salgılanırken, Gram negatif bakterilerde periplazmik boşlukta salgılanır. Antibiyotiği reseptör bölgeye ulaşana kadar etkisiz hale getirirler. Antimikrobiyallere bakteriler β-laktam inaktive edici enzimler (β-laktamazlar) üreterek veya mutasyona uğramış PBP türleri ile direnç gösterirler. β-laktamaz enzimleri kromozomal veya plazmid denetiminde sentezlenirler. Gram negatif bakteriler arasında konjugasyon yoluyla aktarılırlar.

Gram-negatif bakteriler, dirençli gen veya gen mutasyonu ile çoğunlukla antibiyotiklere dirençli hale gelirler. Antibiyotiğin seçici baskısı, direnç artışını beraberinde getirir. Geniş spektrumlu yeni antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı sorunu daha da karmaşık hale getirir.

B-laktamaz enzimleri β-laktam halkasını ikiye bölerek etki ederler. İki ana etki mekanizmaları vardır. İlk olarak, en yaygın serin bazlı bir etki mekanizmasına sahiptir. Amino asit dizileri temelinde üç ana sınıfa ayrılırlar (A, C ve D). Substrat bağlanma açısından konformasyonel esnekliğe sahip olmak için gevşek şekilde inşa edilmiş olan

zeminde bir boşlukta (oksianyon cep), dar uzunlamasına bir oluktan oluşan aktif bölge bulundururlar. Buna yakın yerde, serin kalıntısı geri dönüşü olmayan bir şekilde β-laktam halkasındaki **karbonil karbon** ile reaksiyona girer (Şekil 2.4.) ve β-laktam halkası inaktifleşir. Bunlar birçok penisilin, sefalosporin ve monobaktama karşı etkilidir.



Şekil 2.4. β-laktamazın moleküler yapısı.

İkincisi daha az karşılaşılan β-laktamaz grubu, metallo β-laktamazlar veya B sınıfı β-laktamazlardır. İki değerlikli bir geçiş metal iyonu (çinko) kullanır, bir histidin veya sistein kalıntısına veya her ikisine birden bağlı **amid bağının karbonil grubu** ile reaksiyona girer. Monobaktamlar dışındaki çoğu penisilin, sefalosporinler ve karbapenemlere etki eder.[45][47-49]

2.4. Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları;

2.4.1. İlacı İnaktive Eden Enzimlerin Üretimi

Antibiyotikleri inaktive eden enzimler; β-laktamazlar, Asetil transferazlar, fosfotransferazlar, adeniltransferazlar, aminoglikozid modifiye eden (yapısını değiştiren) enzim ve karbapenemazlardır. Çoğunlukla görülen beta-laktam direnci, pek çok bakteri türlerinde beta-laktam antibiyotikleri parçalayan beta-laktamaz enzimlerinin oluşması ile gerçekleşir. Gram-negatif bakterilerde beta-laktamazlar periplazmik alanda olması sebebiyle az miktarı bile antibiyotiklerin inaktive edilmesi için yeterlidir. Gram-pozitif bakterilerde, hücre mebranından salgılanan beta-laktamazların, enzim miktarı daha fazla olacaktır.[50, 51]

2.4.2. Hedef Moleküllerde Değişiklik Meydana Gelmesi

Penisilin bağlayan proteinlerin çok fazla üretilmesi, reseptörün afinitesinde azalma ya da daha çok dirençli bir PBP ile rekombinasyon oluşturması, nokta mutasyonları, ilaçtan etkilenmeyen farklı metabolik yolun kulanılması gibi farklı mekanizmalarla direnç ortaya çıkmaktadır. *E. coli*'deki PBP3 sentezlenip salınması buna iyi bir örnek oluşturur.

2.4.3. Hücreye Giren İlaç Miktarının Azalması (Permeabilitenin Azalması)

Gram-negatif bakterilerde en iyi karakterize edilmiş porinler büyük (outer membrane protein)OmpF, küçük OmpC kanalı ve mutant phoE kanallarından oluşan porin kanalları sayısını azaltarak veya porinde değişiklik yaparak hücreye girecek antibiyotik miktarını azaltır ya da engeller.

2.4.4. Hücreye Giren Antibiyotiğin Dışarı Pompalanması

Hücre içine giren ilacın ATP bağımlı bir mekanizma ile aktif pompa (efluks) sistemleri ile hücre dışına pompa ile atılmasıdır. *E.coli* izolatlarında marRAB operonunun mutasyonu sonucu beta-laktam, kloramfenikol, florokinolon ve tetrasiklin direnci oluşmaktadır.[52, 53]

2.5. β-laktamazların Sınıflandırılması

Ambler moleküler sınıflandırma şeması ve Bush-Jacoby-Medieros fonksiyonel sınıflandırma sistemi şeklinde iki sınıflandırma vardır.[54, 55]

Ambler moleküler sınıflandırma: β-laktamaz enzimlerini, fenotipik özelliklere değil de protein homolojisine (amino asit ve nükleotid dizilerine, moleküler yapı) göre dört sınıfa (A, B, C ve D) ayırır. A, C ve D sınıflarının β-laktamazları β-laktam hidrolizinde serini kullandıkları için serin β-laktamazlardır. B sınıfı enzimler çinko iyonunu kullandıkları için metallo β-laktamazlardır. GSBL'lerin çoğu, OXA tipi enzimler (D sınıfı enzimler) haricinde, moleküler sınıf A'dır.

Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflandırma: Fonksiyonel benzerliklere (substrat ve inhibitör profilleri) dayanır. Fonksiyonel sınıflandırmasında antimikrobiyal substrat profili, enzim inhibisyon profili, enzim net yükü (pI), hidroliz hızı (Vmax), bağlanma afinitesi (Kd), izoelektrik odaklanma, protein moleküler ağırlık ve amino asit bileşimi gibi çeşitli kriterler kullanılmıştır. Bu sistemde dört ana grup (1-4) ve birden fazla alt grup (a-f) vardır.[47, 56]

Tablo 2.2. β-laktamazların Sınıflandırılması [51]

β-laktamazların Sınıflandırılması Bush-Jacoby grup (2009)	Moleküler sınıflandırma	Özgün substrat	İnhibisyon		Temsil eden enzimler
			CA/TZB[a]	EDTA	
1	C	sefalosporinler	Yok	Yok	E.coli AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	sefalosporinler	Yok	Yok	GC1, CMY-37
2a	A	Penisilinler	Var	Yok	PC1
2b	A	Penisilinler,sefalosporinler	Var	Yok	TEM-1 TEM-2 SHV-1
2be	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	Var	Yok	TEM3, SHV-2 CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penisilinler	Yok	Yok	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	Yok	Yok	TEM-50
2c	A	Karbenisilin	Var	Yok	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Karbenisilin, Sefepim	Var	Yok	RTG-4
2d	D	Kloksasilin	Değişken	Yok	OXA-1, OXA-10
2de	D	Geniş spektrumlu sefalosporinler	Değişken	Yok	OXA-11, OXA-15
2df	D	Karbapenemler	Değişken	Yok	OXA-23, OXA-48
2e	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler	Var	Yok	CepA
2f	A	Karbapenemler	Değişken	Yok	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Karbapenemler	Yok	Var	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B	Karbapenemler	Yok	Var	CphA, Sfh-1

a Piperasilin/tazobaktam

Grup 1 β-laktamazlar: Birçok *Enterobacteriaceae*'nin kromozomlarında kodlanan moleküler sınıf C'ye ait sefalosporinazlardır ve Amp C olarak da isimlendirilir. Sefalosporinleri benzilpenisiline göre daha hızlı hidroliz eder ve genellikle klavulanik asit ve sulbaktamdan etkilenmezler. Aztreonam ve kloksasilin tarafından inhibe edilir. Bu grup enzimler normalde düşük düzeyde sentezlenirler amoksisilin, ampisilin, imipenem gibi belirli β-laktamlar ve klavulanik asit gibi β-laktamaz inhibitörüne maruz kaldığında indüklenebilir ve enzimin sentezi yüksek seviyeye ulaşmış olur. İndüklenebilir AmpC β - laktamazları *P. aeruginosa, Enterobacter spp., C. freundii, S. marcescens, M. morganii, Providencia spp* tarafından üretilir.[57]

Grup 2 β-laktamazlar: Bu β-laktamazlar plazmidler aracılığıyla taşınan genler ile sentezlenip daha hızlı bakteriler arasında yaygınlaşırlar. penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre 6 alt gruba ayrılırlar Moleküler sınıf A ve D'de yer alır en büyük β-laktamaz grubunu temsil ederler.

Alt grup 2a penisilinazlar, Penisilini hidrolize eden, klavulanik asite duyarlı enzimlerdir. Nispeten sınırlı bir hidrolitik aktivite spektrumuna sahip küçük bir β-laktamaz grubudur ve Gram-pozitif koklarda baskındır.

Alt grup 2b β-laktamazlar, Penisilinleri ve sefaloridin ve sefalotin gibi erken sefalosporinleri kolayca hidrolize eder ve klavulanik asit, tazobaktam gibi β-laktamaz inhibitörleri ile güçlü bir şekilde inhibe edilir. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerini içerirler.

Alt grup 2be, Genişletilmiş aktivite spektrumu için "e" harfi ile üçüncü kuşak sefalosporinleri (seftazidim, sefotaksim ve sefpodoksim) ve monobaktamları (aztreonam) inaktive edebilen GSBL'lerden oluşur. Alt grup 2b β-laktamazların penisilinler ve sefalosporinlere karşı aktivitesini korur ve ek olarak sefotaksim, seftazidim, aztreonam gibi bir veya daha fazla oksiimino-β-laktamı hidrolize eder. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1'deki amino asit ikamelerinden ortaya çıkmıştır. TEM ve SHV GSBL'ler, Kluyvera türlerinde kromozomal olarak belirlenen β-laktamazlarla ilişkili olan işlevsel olarak benzer ancak daha hızlı çoğalan CTX-M enzimleri ile birleşmiştir. Çoğu CTX-M enzimi sefotaksim'i seftazidime göre daha kolay hidrolize eder. Birçoğu sefepimi de hidrolize eder. TEM veya SHV GSBL'lerden farklı olarak,

CTX-M enzimleri tazobaktam tarafından klavulanik asitten en az bir kat daha iyi inhibe edilir. Karakteristik olarak, alt grup 2be β-laktamazlar, klavulanik asit tarafından inhibisyona duyarlıdır.

Alt grup 2br enzimleri, Tazobaktama duyarlı olup "r" harfi klavulanik asit ve sulbaktama bağlanmanın azaldığını gösteren inhibitör dirençli TEM türevi GSBL anlamına gelir. Bugüne kadar bu özelliği gösteren hiçbir CTX-M β-laktamaz olmamıştır.

Alt grup 2ber, Geniş bir spektrumu, klavulanik asit inhibisyonuna göreceli dirençle birleştiren TEM enzimlerini içerir. Klavulanik asit direncindeki artışı orta düzeydedir.

Alt grup 2c penisilinazlar, Karbenisilin veya tikarsilini benzilpenisilin kadar hızlı hidrolize etme, kloksasilin veya oksasilin ile benzilpenisilinin yarısından daha düşük oranlarda hidrolize etme kabiliyetleri ile karakterizedir.

Alt grup 2ce, Sefepime ve sefpiroma karşı genişletilmiş aktiviteye sahip geniş spektrumlu karbenisilinaz RTG-4'ü (CARB-10) içerir.

Alt grup 2d, Kloksasilin veya oksasilini benzilpenisilinden daha hızlı hidrolize eder. Karbenisiline karşı bir miktar aktivite gösterir, klavulanik asit ve sulbaktama dirençli ve bazıları GSBL'dir. OXA enzimleri olarak bilinir. Altgrup 2'nin tüm enzimleri moleküler sınıf A iken bu grubun enzimleri moleküler sınıf D'dir.

Yeni alt grupta 2de, Oksimino-β-laktamları içeren geniş bir spektruma sahip kloksasilin veya oksasilin hidrolize edici enzimlerdir. Genellikle Seftazidime dirençleri sefotaksim veya aztreonama dirençten daha belirgindir.Bu enzimler OXA-10'dan 1-9 amino değişikliği ile ortaya çıkmıştır.

Yeni alt grup 2df, Karbapenemi hidrolize eden OXA enzimleridir. En sık *Acinetobacter baumannii'*de görülmüştür.

Alt grup 2e Sefalosporinazlar, Geniş spektrumlu sefalosporinleri ve monobaktamalrı da hidrolize eder ve klavulanik asit veya tazobaktam tarafından inhibe edilirler. Aztreonama zayıf afiniteleri ile AmpC enzimlerinden ayrılırlar.

Alt grup 2f. Karbapenemler, Karbapenemleri hidroliz etmekte, klavulanik asit ile inhibe olmaktadırlar. Klavulanik asitten daha çok tazobaktam ile iyi inhibe edilirler. Kromozomal ve plazmidle kodlanabilir. Serin bazlı karbapenemazlardır. [56]

Grup 3 Metalloβ-laktamazlar (MBLs), Genellikle klinik izolatlarda ikinci veya üçüncü bir β-laktamaz ile kombinasyon halinde üretilir. Aktif bölgede çinko iyonu bulundurur Karbapenemleri hidrolize etme yetenekleriyle ayırt edilmişlerdir, ancak şimdi bazı serin β-laktamazlar da bu yeteneği kazanmışlardır. Serin β-laktamazların aksine, MBL'lerin monobaktamlar için zayıf afinitesi veya hidrolitik kapasitesi vardır ve β-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler.

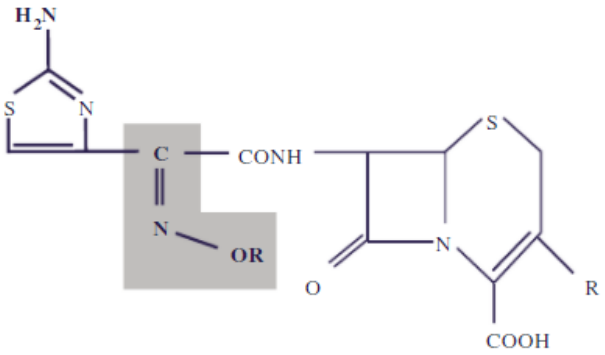
Grup 4 β-laktamazlar Daha önce 1995 fonksiyonel sınıflandırmaya dahil edilmiş klavulanik asit tarafından inhibe edilmeyen penisilinazlardır fakat hakkında daha fazla bilgi mevcut olmadığı için tam olarak karakterize edilmediğinden bir moleküler sınıfa dahil edilmemiştir. Mevcut şemadan 2009 yılında çıkarılmıştır.[47] [56]

Ambler sınıflandırmasında sınıf A veya D'de yer alan GSBL'ler, sefamisinler (sefoksitin, sefotetan) ve karbapenemler hariç tüm β-laktam antibiyotikleri hidroliz ederek inaktifleştirir. Bu enzimler genelde klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi β-laktamaz inhibitörleri ile inhibe edilir.[58]

Çoğu GSBL, aktif bir bölge serine sahip olan ve çoğunlukla klavulanik asit tarafından inhibisyona duyarlı olan Ambler isimlendirmesinin A sınıfına aittir. GSBL üreten suşlar bazı genişlemiş spektrumlu β-laktamazlara duyarlı gibi görünse de MİK değerinde inokülüm etkisi görülür. GSBL üreten mikroorganizmaların bakteri sayısının yüksek olduğu durumlarda, direnç düzeylerinin yükseldiğini açıklar. Antibiyotik duyarlılık testlerinde önerilen inokülüm düzeylerinde $5x10^5$ bakteri/ml duyarlı bulunan bakteri topluluğu, enfeksiyon bölgesinde 10^7 bakteri/ml bakteri yoğunluğu antibiyotiğin minimal intibitör konsantrasyon (MİK) düzeylerinin yükselmesine neden olmaktadır. Bu sebeple GSBL varlığının saptanabilmesi çok önemlidir.[47,48][51]

2.6. Geniş Spektrumlu β-laktamaz (GSBL)

Bakteriyel suşların çok sayıda β laktama kalıcı olarak maruz kalması, bakterilerde sefamisinler (sefoksitin, sefotetan) veya karbapenemler (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) hariç olmak üzere dinamik ve sürekli bir β laktamaz üretimini ve mutasyonunu indükleyerek aktivitelerini seftazidim, sefotaksim ve sefepim gibi üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere hatta aztreonama karşı genişletmiştir.[146]



Şekil 2.5. Bir oksiimino-aminotiyazolil sefalosporinin yapısı.[59]

Sefuroxime, sefotaksim, seftriakson, seftazidim, sefepim ve sefpiromun tümü bu yapıya sahip olup C = N – OR β-laktam halkasınının kalkanlarıdır, sert yapısıyla klasik β-laktamazların etkisinden korur, ancak GSBL'den korumaz.

Bazı suşlar yapısal veya indükleyici olarak kromozomal β-laktamaz üretirler. Bazıları plazmid aracılı β-laktamazlar ile dünya çapında yayılmıştır. İlk plazmid aracılı β-laktamazlar, TEM-1 1960'ların başında tanımlandı. Plazmidler üzerindeki transpozonlarla TEM-1 genleri yayıldı. SHV-1, Gram negatifler arasında sıkça rastlanan plazmid aracılı diğer β-laktamazlardır. Şimdi bilinen geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize edebilen ilk plazmid aracılı β-laktamaz SHV-2'dir. Bir dizi başka genişlemiş hidrolitik aktiviteye sahip β-laktamaz grupları rapor edilmiştir. Bu GSBL enzimleri, plazmid kaynaklı olup TEM-1, TEM-2 ve SHV-1'in aktif bölgesinin konfigürasyonunu değiştiren nokta mutasyonlarından gelişmiştir. Başlıca GSBL tipleri SHV, TEM, CTX-M, GES, OXA, VEB, PER, BEL, BES, TLA, SFO, IBC enzimleridir. TEM ve SHV olmayan tercihen sefotaksime karşı hidrolitik aktivite gösteren enzim belirlenerek CTX-M-1 olarak adlandırıldı.[9]

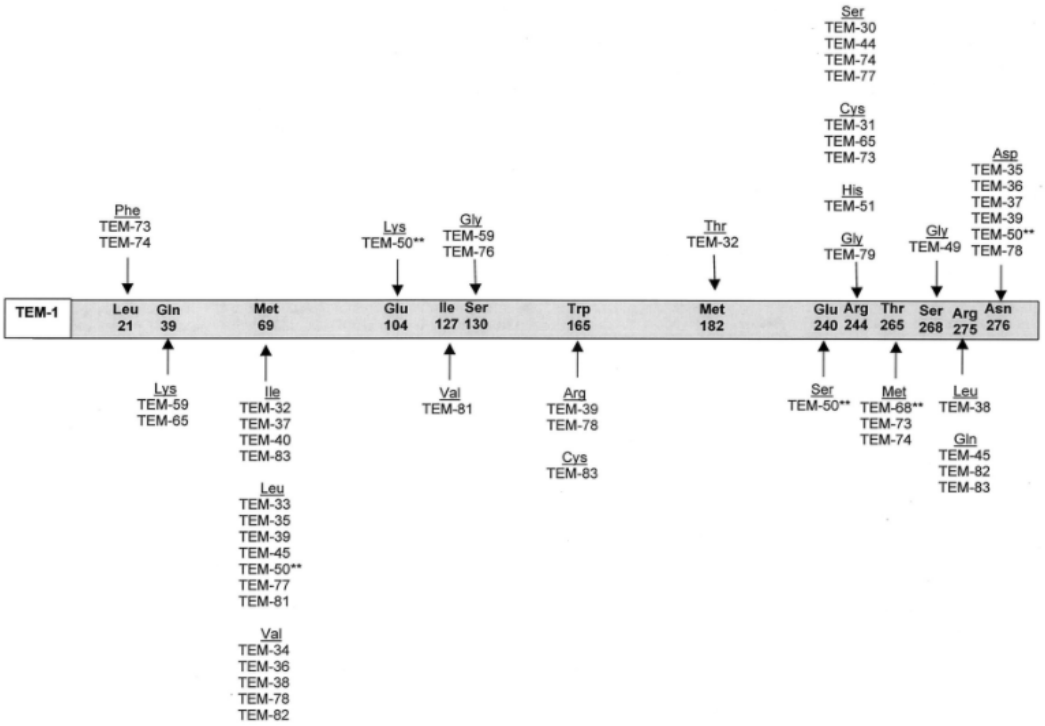
Her yeni beta-laktam antibiyotiğin kullanımından bir süre sonra bakteri tarafından yeni bir beta-laktamaz üretimiyle karşılaşılmaktadır. GSBL üreten bakteriler çoklu ilaç direnci ile ilişkili olabilirler. Direnç mekanizmalarına sahip genler genellikle GSBL geni ile aynı plazmid üzerinde bulunduğundan bazı GSBL üreten suşlar ayrıca kinolonlara, aminoglikozitlere ve trimetoprim-sülfametoksazole direnç gösterirler. DNA tamir sistemlerinin ve DNA kopyalarını okuma-doğrulama sistemlerinin inaktive olmasıyla, bakterilerde mutasyona aşırı eğilim (hypermutability) gerçekleşir. Böylece karşılaşacağı diğer antibiyotiklere direnç geliştirmeye hazır olurlar [60]. Geçmişte

tanımlanan en yaygın GSBL'ler daha önceki penisilinazların mutasyonu ile gelişmiş TEM ve SHV'dir[50]

2.6.1. GSBL TİPLERİ

2.6.1.1. TEM

İlk olarak 1965'te bir *E. coli* izolatında, penisilinleri ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilen ancak oksiimino sefalosporinlere etkisi olmayan TEM-1 bildirilmiştir. TEM-1'deki mutasyon sonucu bir aminoasit değişikliği ile TEM-2 ortaya çıkmıştır. Bu değişiklikler enzimin aktif bölgesini aminothiazolili yeniden modelleyerek sefalosporinlerinlerin çoğuna etkiyi arttırır. TEM-1 en yaygın β-laktamazlar olup ampisiline dirençli *E. coli*'lerin %90'ında direncin sorumlusu olduğu tahmin edilmektedir. Genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere karşı artan aktiviteye sahip ilk TEM varyantı TEM-3'tür.



Şekil 2.6. TEM GSBL türevlerinde amino asit ikameleri. TEM-1 β-laktamazın yapısal genindeki aminoasitler gri çubuk üzerinde olup aminoasit numaralanması Ambler ve ark. tarafından yapılmıştır.

TEM-tipi β-laktamazlar en çok *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de, diğer Gram-negatif bakteri türlerinde de artan sıklıkta bulunmaktadır. *E. aerogenes, M. morganii, P. mirabilis, P. rettgeri* ve *Salmonella spp* ayrıca, *Enterobacteriaceae* olmayan Gram-negatif bakterilerde bulunmuştur.[45, 61, 62][57]

2.6.1.2. SHV

GSBL'ler içerisindeki bir diğer önemli enzim grubu SHV'dir. Bu sınıfın enzimlerinin prototipi SHV-1 olup çoğunlukla *K. pneumoniae'*da bulunmaktadır. *K. pneumoniae* suşunda, SHV-1'i kodlayan gen veya onun öncüsü görünen LEN-1 bakteri kromozomunda bulunmuş, SHV-1 geni *Klebsiella*'da bir kromozomal gen olarak diğer *enterobakteri* türlerine yayılan bir plazmide dahil edilerek evrimleşmiş olabileceği ve SHV-1'i kodlayan genin, transpoze edilebilir bir elemanın parçası olarak var olabileceği varsayılsa da, hiçbir zaman kanıtlanmamıştır.

BlaSHV'deki değişiklikler, yapısal gen içinde küçük değişikliklerle meydana geldiği için az sayıda SHV-1 türevi vardır. Bir GSBL fenotipine sahip SHV varyantlarının çoğu, 238. pozisyonda glisin yerine serin gelmesi ile karakterize edilir. SHV-5 varyantlarında ise ayrıca 240. pozisyonda glutamat yerine lizin gelmiştir. Gly238Ser ve Glu240Lys amino asit ikamelerinde 238 konumundaki serin artığı (residü), seftazidimin verimli hidrolizi için lizin artığı, sefotaksimin verimli hidrolizi için kritiktir.

Enterobacteriaceae ailesi dışında, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.'*ye yayılmıştır. SHV-1, ampisilin, tigesiklin ve piperasilin gibi geniş spektrumlu penisilinlere direnç gösterir fakat oksiimino ikameli sefalosporinlere karşı etkisi yoktur. *K. pneumoniae* suşunda, plazmit aracılı ampisilin direncinin% 20'sinden sorumludur.[45, 59, 61]

2.6.1.3. OXA

Ambler moleküler sınıflandırmasında D sınıfında ve fonksiyonel grup 2d'ye ait olup, TEM ve SHV enzimlerinden farklıdır. Ampisilin ve sefalotine direnç sağlarlar ayrıca oksasilin ve kloksasiline karşı yüksek hidrolitik aktivite ve klavulanik asit tarafından zayıf bir şekilde inhibe edilirler. Oksasiline yüksek afinite gösterdikleri için OXA adını almıştır. Çoğunlukla *P. aeruginosa'*da görülürler. Ancak diğer Gram negatif

bakteride de tespit edilmiştir. En yaygın OXA-1 β-laktamaz *E. coli* izolatlarının % 1ve %10'unda bulunmuştur. En önemli özellikleri seftazidime yüksek direnç göstermeleridir. OXA-17 istisna olup sefotaksim ve seftriaksona dirençlidir. Birçoğu OXA-10'dan türetilmiş olup, OXA-10 varyantları iki amino asit ikamesinden birine sahiptir: Yetmiş üçüncü pozisyonda serin için bir asparagin veya 157. pozisyonda glisin için bir aspartat. Özellikle Gly157Asp ikamesi, seftazidime yüksek düzeyde direnç için gerekli olabileceği ve bu mutasyonlardan birinin OXA tipi GSBL fenotipini verebileceği bildirilmiştir.[45, 61, 63]

2.6.1.4. PER

PER-1 beta-laktamaz enzimleri, penisilinleri ve özellikle seftazidim başta olmak üzere sefalosporinleri hidrolize edebilirler, klavulanik asit ile inhibisyona uğrarlar. Beta-laktamaz inhibitörleri, sefamisinler ve karbapenemler de bu enzimlere karşı aktivite gösterirler. TEM ve SHV ile yaklaşık % 25-27 homoloji sağlar. Ülkemizde *P.aeruginosa* ve Acinetobacter türlerinde yaygın olarak bulunmuştur

Diğer GSBL'ler: Yeni enzimler BES-1, CME-1, VEB-1-2, PER, SFO-1, GES-1-2, TLA-1 nadiren görülmektedir.[45]

2.6.1.5. CTX-M

Salmonella enterica serovar *typhimurium, E. coli* izolatlarında ve *Enterobacteriaceae*'nin diğer bazı türlerinde sefotaksimi hidrolize eden yeni bir β-laktamaz CTX -M enzimleri son zamanlarda dünyanın birçok yerinden gelen bir dizi bölgesel salgınla tanınmıştır, örn. Japonya'da (Toho-2) , Hindistan (CTX-M-15) ve Bileşik Krallık'ta geniş bir dağılım göstermiştir. CTX-M enzimi ilk defa 1980'lerin sonlarında keşfedilip, yüzden fazla varyasyonu bilinmektedir. Aminoasit dizilerine göre beşe ayrılır. Bu Gruplar CTX-M grup 1, 2, 8, 9 ve 25'tir. CTX-M tip β-laktamazların sefalotini benzil-penisilinden ve sefotaksimi seftazidimden daha iyi hidrolize ettikleri bildirilmiştir. CTX adı, sefotaksime karşı bu β-laktamazların güçlü hidrolitik aktivitesini yansıtmaktadır. Sefotaksimin hızlı hidrolizine ek olarak, bu enzimlerin bir başka özelliği, β-laktamaz inhibitörü tazobaktam tarafından sulbaktam ve klavulanattan daha iyi inhibe edilmeleridir

CTX-M-tipi β-laktamaz üreten organizmaların tipik olarak dirençli aralıkta sefotaksim MIC'leri (> 64 μg / ml) bulunurken, seftazidime MIC'leri genellikle görünüşte duyarlı aralıktadır (2-8 μg / ml). Bazı CTX-M tipi GSBL'ler aslında seftazidimi hidrolize edebilir ve bu durum sefalosporine (256 μg / ml kadar yüksek) direnç kazandırır.[63, 64] CTX-M grubu enzimler çoğunlukla *Enterobacteriaceae* ailesinde görülmekle beraber, *P. aeruginosa* ve *S. maltophilia*'da da görüldükleri bildirilmiştir.

Plazmidlerde bulunan direnç belirleyicilerinin bir çoğunun, diğer organizmaların kromozomlarından kaynaklandığına inanılmaktadır ancak, kaynak organizmalarının sadece birkaçı kesin tanımlanmıştır.[65] GSBL'ler içinde CTX-M varyantları daha yaygındır.[66] CTX-M tibi β-laktamazlar son yıllarda tüm dünyada hızlı bir artış göstermiştir. CTX-M (GSBL) yüksek etkiye sahip A sınıfı enzim yalnızca fonksiyonel grup 2'de bulunur. TEM veya SHV β-laktamazlarla çok yakından ilişkili olmayıp CTX-M enzimlerinin kaynağı TEM ve SHV'den farklıdır. TEM ve SHV'ler, ana enzimlerinin amino asit ikameleri ile üretilirken, CTX-M'ler, konjugatif plazmid veya transpozon gibi genetik elemanlar kullanılarak diğer bakterilerden yatay gen transferiyle ilişkili olduğu görülmüştür. *Enterobacteriaceae'*nin CTX-M genlerine bitişik gen dizileri de Kluyvera türlerinin kromozomları üzerindeki β-laktamaz genlerini çevreleyenlere benzerliği de bildirilmiştir. CTX-M sentezleyen bakterilerde aminoglikozid ve florokinolon direncinin (ko-resistan fenomen) beraber görülebiliyor olması nedeniyle seleksiyonu daha kolay olmaktadır [67]. GSBL üreten izolatlar genelde kinolonlar, sulfonamidler, aminoglikozit gibi antibiyotiklere dirençlidir.[68]

Tüm CTX-M enzimlerinde bulunan 237 pozisyonundaki serin kalıntısının (residü), CTX-M tipi β-laktamazların genişletilmiş spektrum aktivitesinde önemli bir rol oynadığı kinetik çalışmalarla bildirimiştir. Gerekli olmadığı gösterilmiş olmasına rağmen, Arg-276 kalıntısı(residü), TEM veya SHV tipi GSBL'lerde Arg-244'e eşdeğer bir pozisyonda bulunduğu oksiimino sefalosporinlerin hidrolizinde rol oynayabileceği açıklanmıştır.[45]

2.6.1.5.1. CTX-M Kronolojisi

1986'da Japonya'da Matsumoto ve ark. sefotaksime dirençli *E. coli* suşunu bir laboratuvar köpeğinin dışkı florasından izole etmiştir. TEM ve SHV olmayan GSBL

keşfederek FEC-1 olarak adlandırdı.[69] Almanya'da Bauernfeind ve ark.1989'da sefotaksimi hidrolize eden CTX-M-1 olarak belirtilen sefotaksime dirençli *E. coli* suşu bildirdiler. Güney Amerikada da Salmonella suşlarında sefotaksime dirençli suşlar yayılmaya başlamıştır.[70] 1992'de aynı GSBL tipi MEN olarak rapor edildi. Barthelemy ve ark.1992'de amino asit sekansı karşılaştırmasında *E coli* suşundan izole edilen MEN-1'i [71] K. oxytoca'nın kromozom aracılı β-laktamazları ile (% 72'den fazla benzerlik) yaygın TEM'lerden veya SHV-1 penisilinazlarından (% 39'dan az özdeş) doğrudan türetilmemiş, ilk transfer edilebilir (plazmid aracılı) GSBLolduğunu bulmuşlardır [72]. Ishii ve ark.1995'te sefotaksime dirençli *E. coli'*den üretilen Toho-1 *K. oxytoca* kromozomunun aracılık ettiği beta-laktamaz ve *E. coli.*'nin MEN-1 plazmidinin aracılık ettiği beta-laktamaz ile % 83 homolog olduğunu rapor etmiştir [73] 1996'da TEM ve SHV olmayan GSBL kodlayan gen sekanslanmasıyla CTX-M'in MEN-1 ile aynı olduğunu sefotaksime dirençli CTX-M-2 olarak belirtilen enzimin Toho-1 varyantı olduğu görüldü [74] Polonya'da Gniadkowski ve ark.1996'da *Enterobacteriaceae* familyasının farklı üyelerinde CTX-M-1 / MEN-1 β-laktamaz ile çok yakından ilişkili yeni bir CTX-M-3 enzimi ürettiğini ortaya çıkarmıştır [75] Türkiye de CTX-M enzimleriyle ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. [76]1990'ların sonlarından itibaren, CTX-M β laktamaz üreten *E. coli'*yi toplum kökenli İYE'lerin önemli bir nedeni olarak tanımlanmıştır [77]. CTX-M gibi GSBL'leri kodlayan genlerin yayılması son derece endişe vericidir. BlaCTX - M genleri, *Kluyvera spp*. olarak adlandırılan çevresel bakterilerin kromozomlarından mobil elemanlar (dizilim dizisi IS Ecp1) tarafından yakalanan genlerle kaynaklanır, Kluyvera türlerinin β-laktamazları, bazı plazmid CTX-M tiplerinin olası progenitörleridir. Farklı genetik elementlerin, ISEcp1 ve ISCR1 yerleştirme dizileri veya faj ile ilişkili elementler de blaCTX - M genlerinin edinilmesinde rol oynadığı bulunmuştur [67]

2.6.1.5.2. CTX-M GSBL'ler

TEM ve SHV'den türetilen GSBL'lerin aksine, CTX-M beta-laktamazlar sefotaksim ve seftriaksonu seftazidimden daha iyi hidrolize eder. klavulanik asite göre tazobaktam tarafından daha kolay inhibe edilirler.

CTX-M beta-laktamazlar genellikle *K. pneumoniae, E. coli,* tifoidal ve tifoid olmayan *Salmonella, Shigella, C. freundii, Enterobacter spp*. ve *S. marcescens*'de

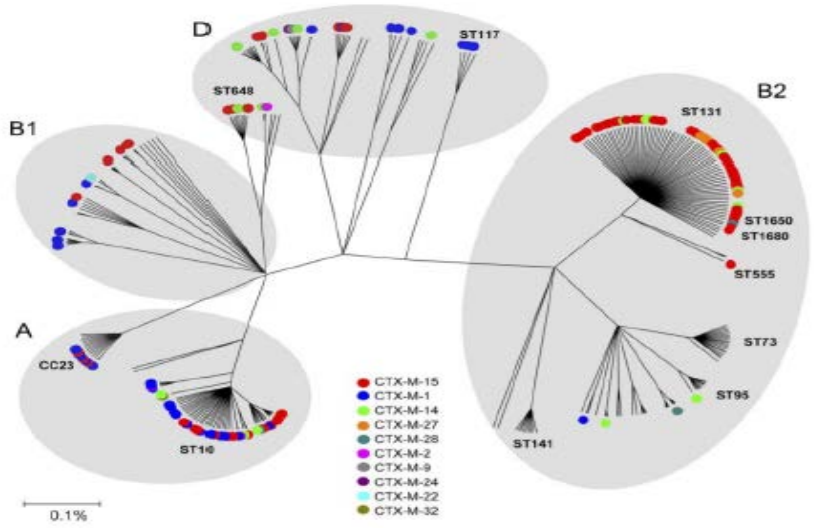
görülmüştür. CTX-M-1, CTX-M-2, **CTX-M-3,** CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, **CTX-M-15**, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-20 ve CTX-M-21 enzimleri kodlayan ORF'lerin akış yukarısında (upstream) plazmidler ve ekleme dizileri (örneğin ISEcp1 veya ISEcp1 benzeri ekleme dizileri) sürekli bildirilerek blaCTX-M genlerinin mobilizasyonunda farklı genetik unsurların rol oynayabileceği kanaatine varılmıştır.

CTX-M beta-laktamazlarda hidroliz için substrat özgüllüğün yer alan anahtar amino asitler; Asn104, Asn132, Ser237 ve Asp240 tanımlanmıştır.[78]

2.6.1.5.3. CTX-M Enzimlerinin Filogenetik grupları ve Orjinleri

CTX-M ile ilişkili en yakın β-laktamazlara %62-%75 oranında benzeyen, *Serratia fonticoa, Klebsiela oxytoca, Proteus vulgaris* ve *Citrobacter koseri'*nin kromozomal sınıf A enzimleridir.

CTX-M enzimlerinin *E. coli'* de filogenetik dağılımı Şekil 2.5'te gösterilmiştir.[79]



Şekil 2.7. *E. coli'*de CTX-M Enzimlerinin Filogenetik Dağılımı

Her grubun üyeleri >%94 benzerlik gösterirken, farklı gruplara ait üyeler arasında <=%90 benzerlik belirlenmiştir.

CTX-M enzimleri amino asit dizileri temelinde beş farklı alt gruplara (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-25) ayrılmıştır;

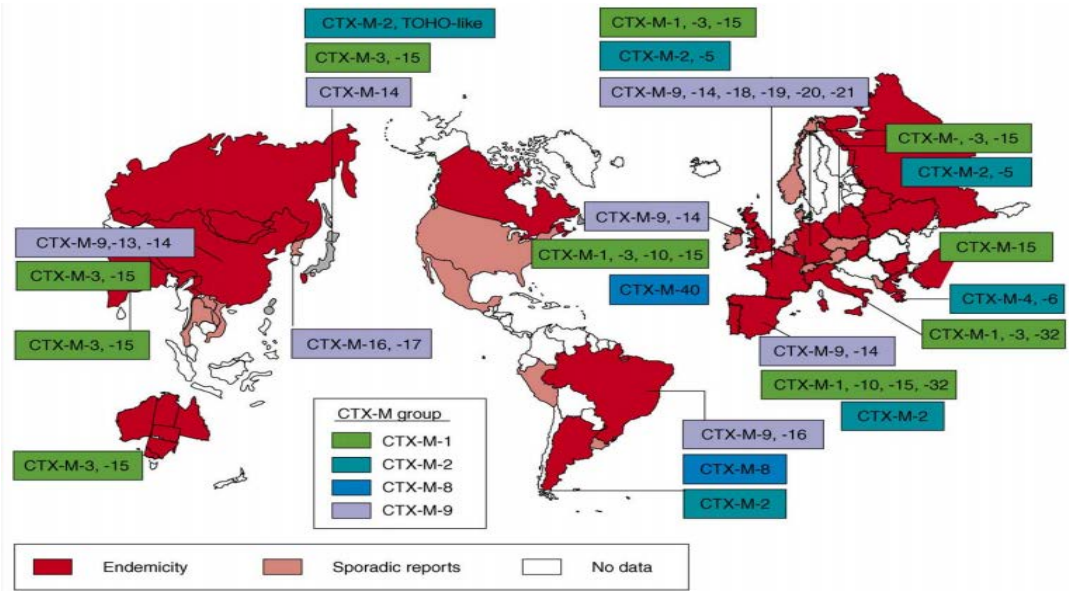
CTX-M-1 (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15, FEC-1, CTX-M-22, CTX-M-23 ve CTX-M-28),

CTX-M-2 (CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTXM-7, CTX-M-20 ve Toho-1(CTX-M-44)),

CTX-M-8 (CTX-M-8 ve CTX-M-40),

CTX-M-9 (CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27 ve Toho-2 (CTX-M-45), CTX-M-24,

CTX-M-25: CTX-M-25 ve CTX-M-26 enzimlerini içerir [80].



Şekil 2.8. CTX-M Gruplarının Dağılımı

Farklı CTX-M'ler tüm coğrafi alanlarda eşit dağılmamıştır. Avrupa ülkelerinde endemik bir durum olduğu söylenebilir. CTX-M-9 grubu, Akdenizi çevreleyen ülkelerde ve Birleşik Krallıkta, CTX-M-2 Güney Amerika ve Japonya'da izole edilmiş, CTX-M-15 neredeyse tüm dünyaya yayılmıştır.[72]

2.7. GSBL'lerin belirlenmesi

Sağlık Koruma Ajansı, HPA, 2005'te özel raporlama kılavuzları yayınlanmıştır Onaylanmış tüm GSBL üreticileri için, genel fikir birliği ile GSBL üreticilerinin rutin antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarından bağımsız olarak tüm penisilinlere, sefalosporinlere (sefamisin, sefoksitin ve sefotetan hariç) ve aztreonama dirençli olarak bildirilmesi gerektiğini ancak özellikle beta-laktam / beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarının (örn. Piperasilin-tazobaktam, amoksisilin-klavulanat ve ampisilin-

sulbaktam) bu kuraldan etkilenmeyip, rutin duyarlılık testlerinde elde edildiği şekilde rapor edilmesi gerektiği belirtilmiştir.[78]

GSBL üreten *E. coli, K. pneumoniae ve K. oxytoca*'nın GSBL tarama için hem sıvı dilüsyon hem de disk difüzyon yöntemleri CLSI tarafından Seftazidim, sefotaksim, seftriakson veya aztreonam için MIC 2 µg / ml iken sefpodoksim için MİK 8 µg / ml olarak tavsiye edilmektedir. Tarama için yukarıdaki ajanlardan birden fazlasının kullanılması, GSBL tespitinin hassasiyetini arttırır. GSBL üretimi saptandığında fenotipik doğrulama testleri ile araştırılmalıdır.

Laboratuvarlar disk difüzyon yöntemini kullanıyorsa *E. coli, K. pneumoniae, K. oxytoca* seftazidim (22 mm), sefotaksim ve aztreonam (27 mm) ve seftriakson (25 mm), Cefpodoxime (17 mm) değerlerden daha düşük zon inhibisyon çapına sahip olduklarında fenotipik doğrulayıcı testlerle araştırılmalıdır.

GSBL'yi saptamak için kullanılan kriterler, MIC'lerle ve sefalosporinlerin ve aztreonamın zon çapı inhibisyonu yakından ilişkili değildir. Ayrıca, GSBL'leri kodlayan bla genleri sıklıkla aminoglikozidler, tetrasiklin ve sülfonamidler gibi diğer antibiyotik sınıflarına karşı direnç belirleyicilerini kodlayan aynı plazmidde bulunduğundan, bir izolat aminoglikozitlere direnç gösterdiğinde GSBL doğrulama testi yapılmalıdır.[78]

2.7.1. GSBL Doğrulama Testleri

Enterobacteriaceae arasındaki sefalosporin direnci, büyük ölçüde CTX-M-β-laktamazların çoğalmasıyla, doğası ve dünya çapında prevelansı değişmektedir. Birleşik Krallık'ta, CTX-M GSBL'ler 2000'den önce bilinmezken şimdi sefalosporine dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae* arasında baskın mekanizma olup, doğrudan duyarlılık testi sonuçlarına bakılmaksızın, GSBL üreticilerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sefalosporinlerden kaçınılması gerektiği yaygın olarak kabul edilmektedir.[81] Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) tarafından Sefalosporin sınır değerlerinin revizyonu gerçekleştirilmiştir ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından MİK değerlerinin klinik sonucu tahmin etmede önemli faktör olduğunu göstermiştir.[82] Livermore GSBL tespiti için CTX-M enzimlerinin ortaya çıkmsıyla tek başına seftazidim ile taramanın artık tavsiye edilemeyeceğine dikkat çekmiştir. Bunun yerine, laboratuvarlar tüm *Enterobacteriaceae* izolatlarını ya sefpodoksim (tüm GSBL'ler için en iyi genel substrat) veya hem

sefotaksim hem de seftazidim ile taramalı, bu sefalosporinlerden herhangi birine dirençli bulunan izolatlar daha sonra GSBL üreten suşlar sefalosporin / klavulanat sinerjisi açısından test edilmesi gerektiğini vurgulamıştır.[83]

Çift Disk Sinerji Testi: Jarlier ve arkadaşları tarafından geliştirilen çift disk sinerji testi GSBL'lerin tespitinde güvenilir bir yöntem olmayı sürdürmektedir. McFarland 0.5 bulanıklık standardına eşdeğer bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton besiyerine yayılır. Amoksisilin-klavulanat (AMC) içeren bir disk, seftazidim (CAZ) veya başka bir oksiimino-sefalosporin içeren bir diskin 20-30 mm yakınına yerleştirilir. Amoksisilin-klavulanat diskindeki klavulanat, agar boyunca yayılır (sinerji) ve seftazidim diskini çevreleyen β-laktamazı inhibe eder. Amoksisilin-klavulanat diske bakan tarafta seftazidim diskinin zonunun artması veya arada bakteri üremeyen bir sinerji alanının bulunması, GSBL üretiminin olduğunu gösterir GSBL tespiti için sefpodoksimin kullanılması tavsiye edilmiştir

Kombine Disk yöntemi: Jacoby ve Han tarafından tasarlanan testte klavulanik asit içeren ve içermeyen seftazidim ve sefotaksim diskleri kullanılır. Klavulanik asit içeren kombinasyon diskleri (seftazidim/sefotaksim + klavulanik asit) etrafındaki inhibisyon zonu, klavulanik asit içermeyen disk (seftazidim/sefotaksim) etrafındaki zona kıyasla ≥5 mm daha geniş olan suşlar GSBL açısından pozitif kabul edilir. Tek başına ilaca kıyasla sulbaktam içeren bir diskte inhibisyon bölgesinde 5 mm'lik bir artış, pozitif bir test olarak kabul edilir.

Üç Boyutlu Test: Thomson ve Sanders tarafından geliştirilen testtir. Test edilecek bakteri plak yüzeyine yayıldıktan sonra plakta bir yarık oluşturulur. Yarığın içine test edilecek bakterinin çoğaldığı sıvı süspansiyonu doldurulur. Antibiyotik diskleri bu yarıktan 30 mm uzağa yerleştirilir. Beklenen dairesel inhibisyon bölgesindeki distorsiyon veya kesintiye uğrama veya bakterinin inokule edildiği hattının yakınında kolonilerin üremesi GSBL pozitif kabul edilir. GSBL tespitinde çok hassastır. Ancak teknik olarak zor ve yoğun emek ister.

Sıvı mikrodilüsyon: Klavulanik asit veya başka bir β-laktamaz inhibitörü ilavesiyle hem de eklenmeden genişletilmiş spektrumlu bir sefalosporin ile gerçekleştirilen seyreltme testlerinde, β-laktamaz inhibitörünün varlığında sefalosporinin MIC'inde bir azalma araştırılır. Kombine edilen antibiyotiğin MİK değeri ≥3 log2 (8 kat) düşük ise GSBL varlığını gösterir.[61]

Etest Yöntemi: Bu yöntemde bir tarafında sefalosporinlerden (seftazidim, sefotaksim, sefepim) birisi diğer tarafta aynı antimikrobiyal ajanın klavulanik asit ile kombinasyonu olan iki taraflı E test GSBL şeritleri kullanılır. Sefalosporin (seftazidim, sefotaksim, sefepim) MİK değerinin, kombinasyonlu MİK değerinden sekiz kat veya daha fazla (≥8 kat) olması GSBL pozitifliğini gösterir. Klavulanik asitin diğer tarafa yayılımıyla şeridin ortasında "hayalet zon" (*phantom zone*) görülmesi de GSBL pozitifliğidir. Bu testin çift disk yaklaşım testinden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu yöntem uygun ve kullanımı kolaydır.

Otomatik mikrobiyal duyarlılık test sistemi (Vitek): Otomatik GSBL mikrobiyal duyarlılık test sistemi - Bu yöntemde ya seftazidim ya da sefotaksim tek başına ve klavulanik asitle (4 µg / ml) kombinasyon halinde kullanılır. Her bir ilacı içerenlere kıyasla klavulanat içeren kuyucuklarda üremedeki azalma, bir GSBL pozitifliğidir. Sanders ve ark. Vitek GSBL testinin GSBL'lerin saptanması için % 99 duyarlı ve spesifik olduğunu bildirmişlerdir. Üretilen β-laktamazın fenotipik doğrulama testlerinin hiçbiri, Gram-negatif bakterilerin GSBL tespitinde % 100 duyarlı veya spesifik değildir.[61]

Moleküler Tayin Yöntemleri: GSBL üretimi genellikle sefalosporin / klavulanat sinerjisine dayalı fenotipik yöntemlerle tespit edilmektedir. Fenotipik yöntemlerden başka GSBL varlığını saptamada moleküler yöntemler de kullanılır. Kesin GSBL genotiplerinin belirler. Bu tür çalışmalar referans veya araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirilir. BlaCTX-M'i tanımlamak için altın standart olarak DNA dizilimini kullanarak blaCTX-M genlerinin varlığını bildirir. PCR, PCR-SSCP *(PCR-single strand conformation polymorphism),* PCR-RFLP *(PCR-restriction fragment length polymorphism),* LCR *(ligase chain reaction),* DNA probları ve nükleotid dizi analizi moleküler yöntemlerdir.[61, 84]

2.8. Tedavi

Amoksisilin-klavulanik asit, nitrofurantoin ve fosfomisin gibi ajanlar, GSBL üreten bakterilere karşı iyi in vitro aktivite gösterirler ve komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisi için seçenek olup randomize kontrollü çalışmalar eksiktir.[85]

Klinisyen, GSBL üreten bakterilerin kinolonlara, aminoglikozitlere ve trimetoprimsülfametoksazole de dirençli olduğunu bilmektedir. Beta-laktamazların

beta-laktam antibiyotikler dışındaki antibiyotiklere etkisinin olmamasından dolayı, kinolonlar GSBL pozitif mikroorganizmalarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilirler. Kinolonlar gibi, aminoglikozidler, organizmanın duyarlılık sınır değerlerinden önemli ölçüde daha düşük bir MİK değerine sahip olması koşuluyla, GSBL üreten patojenlere karşı etkilidir. Gentamisin ve tobramisinin aksine amikasine duyarlılık korunmuş gibi görünmekte ve ampirik tedavide kullanılmaktadır.

CTX-M β-laktamazı taşıyan izolatlar genellikle β-laktam olmayan antibiyotiklere dirençli olup tedaviyi zorlaştırır ve karbapenem kullanımını gerektirebilir. Karbapenemler, GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* ile ciddi enfeksiyonlar için hala ilk tedavi seçeneğidir. GSBL üreten *E. coli, K. pneumoniae* ve *P. mirabilis*'in >% 98'inin hala bu ilaçlara duyarlı olduğu bildirilmiştir. Ancak karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae'*nin ortaya çıkmasıyla, bu organizmaların tedavisi için kullanılabilecek fosfomisinin, GSBL üreten *E. coli* veya *K. pneumoniae*'ye karşı in vitro aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Klinisyenlerin çoklu ilaca dirençli Gram-negatif bakterilerin enfeksiyonlarında son çare olarak kolistin seçenekleridir Karbapenem direnci enterobakteriler arasında ortaya çıktığında, kolistinin ampirik kullanımı gerekir.

CLSI kriterlerinde tigesiklin duyarlılığı henüz oluşturulmamıştır. FDA ve EUCAST, geçici direnç sınır değerleri olarak sırasıyla MİK> 2 μg / ml ve > 1 μg / ml bildirmiş olup, in vitro veriler, tigesiklinin GSBL üreten *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenemlere alternatif olduğu düşünülmektedir.[78]

2.9. Fenotipik Özellikler

2.9.1. β-laktamlara direnç fenotipi

CTX-M kodlayan genin ekspresyon seviyesinin çok zayıf göründüğü *Kluyvera* türleri dışında, CTX-M β-laktamazlar genellikle hem vahşi hem de laboratuar *E. coli* suşlarına aminopenisilinlere (ampisilin veya amoksisilin), karboksipenisilinler (karbenisilin veya tikarsilin), üreidopenisilinler (piperasilin) ve dar spektrumlu sefalosporinler (sefalotin, sefaloridin ve sefuroksim). 7-α-metoksi sefalosporinlere (sefoksitin) ve karbapenemlere (imipenem ve meropenem) duyarlılıkları değişmemiştir. Çoğu oksi-imino sefalosporinler sefotaksim ve seftriaksona karşı yüksek düzeyde direnç

ve sefepime ve sefpiroma çeşitli düzeylerde direnç sağlamış, aztreonamın MİK'leri de yüksektir. Seftazidimin MİK'leri önemli ölçüde artmış olup genelde duyarlı aralıkta kalmıştır. Bununla birlikte, Asp240Gly ikamesini barındıran üç CTX-M enzimi, CTX-M-15, CTX-M-16 ve CTX-M-27, seftazidime karşı sekiz kat daha yüksek direnç seviyeleri sağlar. ebeveyn enzimlerinden, sırasıyla CTX-M-3, CTX-M-9 ve CTX-M14. Pro167Ser ikamesi ile sefotaksimden daha yüksek seviyede seftazidime direnç sağlar. Bu varyantların yakın zamanda ortaya çıkışı, CTX-M enzimlerinin seftazidime karşı geliştirilmiş aktivitenin kazanılmasına yol açmaktadır. β-laktam-inhibitör kombinasyonlarına direnç seviyesi, üretilen enzim miktarına bağlıdır. Klavulanatın amoksisilin ve tikarsilin ile kombinasyonlarının MİK'leri değişiklik gösterir ve çoğu kez duyarlılık veya düşük düzeyde direnç gözlenmiştir. Piperasiline direnç, klavulanat ve tazobaktam inhibitörleri ile kombinasyon halinde sefotaksimde olduğu gibi genellikle tazobaktam tarafından önlenir.

2.9.2. Yapı-Fonksiyon İlişkileri

2001 yılında, CTX-M-19 ilk olarak seftazidim hidrolize eden CTX-M-tipi β-laktamaz olarak rapor edilmiştir. CTX-M-3'ün tek bir amino asit mutantı (Asp240Gly) olan CTX-M-15'i üreten bakterilerin daha sonra hem sefotaksim hem de seftazidime dirençli olduğu gösterilmiştir. CTX-M-tipi-laktamazların, mutasyon yoluyla seftazidimi hidroliz etme yeteneği kazandığını gösterir.[86]

Toho-1 enziminin genel kristal yapısı, A sınıfı GSBL olmayanlara benzerdir. Bununla birlikte, benzilpenisilin, sefalotin ve sefotaksim ile komplekslerdeki Toho-1 açil ara maddesinin kristal yapısı, CTX-M enzimlerinin genişletilmiş spektrum aktivitelerinde yer alabilecek çeşitli özelliklere sahiptir. Arg276.CTX-M kalıntısı enzimleri, çoğu GSBL olmayanlarda substratların ve inhibitörlerin karboksilat fonksiyonları ile etkileşime giren Arg244 kalıntısını içermez. Bu etkileşim, TEM-1 penisilinazın kataliz ve inhibisyon süreci için kritiktir. CTX-M enzimlerinin Arg276 kalıntılarının, Arg244'ün yerine geçeceği tahmin edildi. Bununla birlikte, Arg276'nın ucunun ve çevresinin yönelimi CTX-M enzimlerinde ve TEM ve SHV enzimlerinde farklıdır. Ayrıca, CTX-M-4'teki bir Arg276Asn mutasyonu, TEM-1'de Arg244'ün Ser, Cys, Thr veya His ikamesi ile gözlenen duyarlılıkta önemli azalmanın aksine, inhibitörlere duyarlılıkta önemli bir azalmaya neden olmamıştır. Öte yandan, oksimino-

β-laktamlara karşı nispi hidroliz oranları, Arg276'nın ikame edilmesiyle azaltılır ve Arg276'nın enzim aktivitesinin uzatılması için önemli olduğu hipotezini destekler. Bununla birlikte, Arg276 kalıntısının açil ara yapılarında substrat ile hiçbir etkileşimi yoktur. Kalıntılar Asn104, Asn132, Ser237 ve Asp240.

Önemli bir özellik, TEM ve SHV GSBL'lerin substrat spesifikliklerinin sefotaksim'e uzatılmasında rol oynadığı düşünülen kalıntı Ser237 ile ilgili olup, CTX-M-4 enzimindeki Ser237Ala ikamesi, hem sefotaksim karşısında göreceli hidrolitik aktivitede hem de klavulanat tarafından inhibisyona duyarlılıkta düşüşe neden olmaktadır. Toho-1'in sefotaksim ile kompleks içindeki açil ara yapısı, sefotaksimin metoksiimino grubu ile sterik çarpışmaları önleyen ve sefotaksim'in karboksilat fonksiyonu ile bir hidrojen bağı oluşumuna izin veren Ser237 yan zincirinin dönüşünü gösterir. Shimamura ve arkadaşları, bu etkileşimin, sefalosporinlerin β-laktam halkasının karbonil grubunu asilasyon için oksianyon deliğinde optimal konuma getirmeye yardımcı olduğunu belirtmektedirler. CTX-M enzimlerinin nispeten düşük penisilinaz aktiviteleri, Ser237 tortusu ile tiazolidin halkasının metil grubu arasındaki van der waals temasından kaynaklanabilir.

Asn104, Asn132, Ser237 ve Asp240 kalıntıları, asil-amid-sefotaksim zincirinin amid ve aminotiyazol grupları ile hidrojen bağları oluşturur. Sefotaksim ile kompleks halindeki CTX-M enzimlerinin bu alışılmadık açil ara maddesi, sefotaksim'i bağlanma yerinde sıkıca sabitleyerek oksimino-sefalosporinazların aktivitelerinde rol oynayabilir.

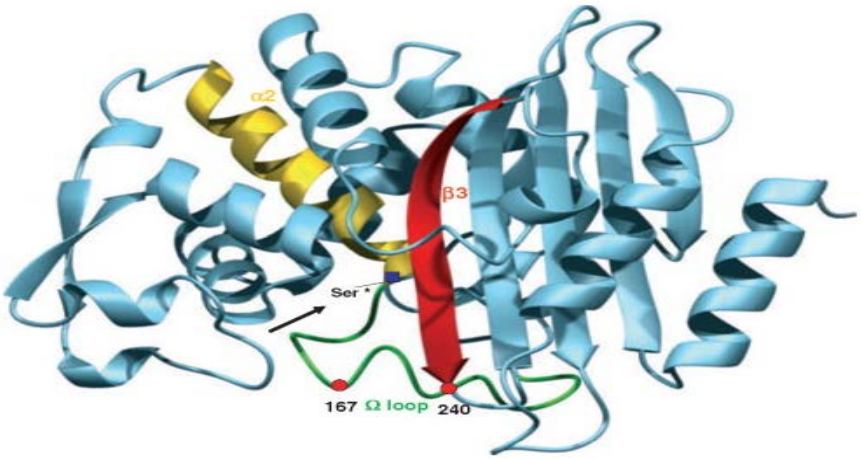
2.9.3. Omega halkası

Toho-1'in yapısı, omega döngüsünün, Toho ile en yakından ilişkili enzim olan *Bacillus licheniformis*'in sınırlı spektrumlu β-laktamazına göre Asn170 ve Asp240'ın çevresinde β3 iplikçiği ile daha az hidrojen bağı etkileşimine sahip olduğunu göstermektedir. Phe160 kalıntısı ile Thr181 ve Asp157 kalıntıları arasında, dar spektrumlu β-laktamazlarda omega döngüsünün N ve C uçlarını birbirine bağlayan hiçbir hidrojen bağı gözlenmemesi, omega döngüsünün esnekliğini artırabilir.

2.9.4. CTX-M enzimlerinin evrimi: Ser167 ve Gly240 kalıntıları.

Ser167 ve Gly240 kalıntıları, yaygın CTX-M enzimlerinde nokta mutasyonları olan, seftazidime karşı geliştirilmiş katalitik verimlilikler sergileyen mutantlardır.

.Mutasyon β laktam bağlanma bölgesini sınırlayan yapısal ögelerin ikisinde, B3 β sarmalının ve Ω döngüsünün (omega loop) terminal kısmında meydana gelir. Bu mutasyonlar enzimin katalitik etkinliğinde artışa neden olur.



Şekil 2.9. CTX-M enzimlerin substrat spektrumunun nokta mutasyonları ile modülasyonu(CTX-M tipi bir enzimin yapısı. DEEPVIEW Programı) H2 α sarmalının sonundaki aktif bölge serin kalıntısıdır. Serin β laktamazlarda olduğu gibi, genel moleküler kat, bir α- sarmal alan (solda) ve bir α/β- domain alanından (sağda) oluşur. Bir okla gösterilen β laktam bağlanma bölgesi, iki alan arasındaki bir yarıkta bulunur. Seftazidimaz aktivitesini artıran aminoasit ikamelerinin meydana geldiği konum 167 ve 240 ya loop döngüsünde (yeşil) veya B3 β-sarmalının terminal kısmında (B3, kırmızı) ve kırmızı noktalarla gösterilmiş.[86, 87]

Mutasyonlar daha önce doğal TEM veya SHV GSBL'lerde gözlenmemiş olup CTX-M-15, CTX-M-16 ve CTX-M-27 enzimleri Asp240Gly ikamesini barındırır. B3 β sarmalının ucunda Asp240Gly ikamesi, β sarmalının esnekliğini attırarak aktif bölgeyi daha hacimli seftazidim molekülü için daha erişilebilir yapar. (CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27'de bulunur) Seftazidimin hidrolizinde önemlidir.

CTX-M'nin sefotaksimaz aktivitesi, omega döngüsünün ve muhtemelen β3 ipliğinin global düzenlemeleri ile de açıklanabilir. Ω döngüsündeki pro167Ser ikamesi, β laktamların bağlanma bölgesi ile etkileşim modunu değiştirir ve seftazidimin iyi tanınmasını sağlar. (CTX-M-9 ve CTX-M-23) Seftazidime karşı geliştirilmiş katalitik verimlilikleri barındıran CTX-M enzimlerinin mutantlarının gözlemlenmesi enzimlerin seftazidim seçim baskısının bir sonucu olarak geliştiğini düşündürmektedir.

Evrimde yer alan kalıntılar, doğal olarak oluşan TEM veya SHV GSBL'lerde hiç gözlemlenmemiş olması CTX-M enzimlerinin muhtemelen tekil bir evrim potansiyelinde olduğunu düşündürür.[67, 88].

2.10. ST131 Bakteriyel Özellikler

2.10.1. Filogenetik Grup ve Serotipler

Ekstraintestinal enfeksiyondan sorumlu izolatlar ve asemptomatik insan dışkısından en sık izole edilen izolatlar *E coli* ST131 filogenetik grup B2'ye aittir.[89]

Le Gall ve arkadaşları. *E coli*'nin filogeni grubundaki tüm B2 izolatlarını gruplandırdı. B2 grubu içindeki 9 altgrupları tespit etti. Clermont ve arkadaşları B2 izolatları altgrup I içine *Ecoli* ST131'i yerleştirdi.[89, 90]

E. coli ST131 izolatları çoğunlukla O25:H4 serotipindedir. Yakın zamanda Japonya, Danimarka, Avustralya, İspanya, Pakistan, Fransa'da ST131 *Ecoli* izolatlarının O16:H5 serotipi tespit edildi.[91, 92]

2.10.2. ST131

Bakteriyel klon, bakterinin eşeysiz üreme ile neslini devam ettirmesidir. Uluslararası çoklu ilaca dirençli yüksek riskli klonların özelliği ise küresel dağılım, çeşitli antimikrobiyal direnç belirleyicileriyle bir ilişki, konakçıda uzun zaman kalıp (> 6 ay) kolonileşmesi, konakçılar arasında etkili bulaşma yeteneği, artmış patojenite ve uygunluk, şiddetli ve / veya tekrarlayan enfeksiyonlara neden olma yetenekleridir.

GSBL üreten izolatlar, Clermont'un triplex PCR tekniğini kullanarak filogenetik grupları A, B1, B2 ve D olarak belirlemek için analiz edilmiştir. O tiplerini belirlemek için de rbf varyantları O1,O2, O4, O6, O7, O12, O15,O16, O18, O25a, O75, O157 ve O25b analiz edilmiştir.

İzolatların klonla ilişkili olup olmadığını belirlemede şu anda kullanılan en yaygın moleküler teknikler; multilocus sekans tipleme (MLST), darbeli alan jel elektroforezi (PFGE), PCR tipleme (enterobakteriyel tekrarlayan intergenik konsensüs [ERIC] veya rastgele amplifiye polimorfiktir. DNA [RAPD] yöntemleri) ve çok odaklı değişken numaralı tandem tekrar analizidir (MLVA).[93, 94]

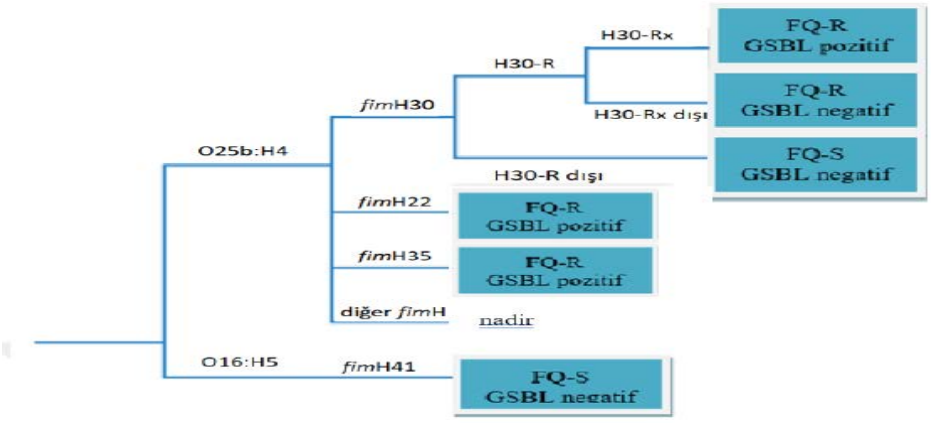
Bugün, *E. coli* ST131, ekstraintestinal sistemde baskın *E. coli* ExPEC olup dünya çapında izole edilmektedir.

Diğer klasik grup B2 ExPEC'in aksine, ST131 izolatları yaygın olarak GSBL taşıması (örneğin CTX-M-15), neredeyse hepsinin florokinolonlara dirençli olması, toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olmaları, çok sayıda virülans gen içermeleri ile patojendir.[1]

İYE'nin önde gelen nedeni *E. coli*, sıklıkla peritonit ve neonatal menenjit enfeksiyonlarına da neden olur.[2] Birden fazla coğrafi bölgede ST131 izolatları blaCTX-M ile neredeyse eşzamanlı olarak tanımlanmış olup çoklu yatay gen transferiyle kazanılan blaCTX-M-15, IncFII plazmitlerde bulunur.

Petty ve arkadaşları 2014'de ST131'i filogenetik incelendiği ilk raporunda ST131'in populasyon yapısını fimH alleline göre üç sınıfa ayırmıştır. Fimbrialar, bakterinin virülans faktörü olup konağa tutunmada kullanır. Özellikle FimH geni konakçı dokudaki mannoz reseptörlerinin tanınması ve bağlanmasından sorumludur. FimH gen oldukça değişken yüksek rekombinasyon bölgesi ve farklı alleller ile ilişkilidir.[95]

ST131 izolatları içindeki en yaygın alt klon H30 olup, fimH geninin tip 1 fimbrial adhezin H30 (fimH30) varyantını içerir. H30 alt klonu, ilk olarak farklı coğrafi bölgelerden ve kaynaklardan izole edilen ST131 izolatlarında fimH, gyrA ve parC genlerinin MLST ve PFGE ile alt tiplendirmesi yapılarak tanımlanmıştır. [96]



Şekil 2.10. *E. coli* ST131'in H30 alt klonlarının ve diğer alt klonlarının popülasyon yapısı [95]

H30 içinde, CTX-M-15 taşıyan H30 suşlar H30-Rx ve GSBL-negatif H30'dan ayrılmış H30-Rx dışı ayrı bir alt soy oluşmuştur.[97]

E.coli ST131 izolatlarında virülans faktör (VF) genlerinden s***at*** (salgılanmış ototransporter toksin), ***fimH*** (tip 1 fimbriae), ***fyuA*** (yersiniabactin reseptörü), ***kpsM II*** (grup 2 kapsül sentezi), ***usp*** (üropatojene spesifik protein), ***mal X***(patojenite adası belirteci), ***iha***(adezin siderofor reseptörü), ***ompT*** (dış membran reseptörü), ***iucD***(

aerobactin), ***iutA***(aerobactin reseptörü), ***tratT*** **'nin** (serum direnci) aynı olduğu bulunmuştur.

EXPEC durumunu tanımlamak için kullanılan beş moleküler faktörden ikisinin (kpsM II ve iutA) varlığına bağlı olarak patojenik *E.coli* ST131izolatlarının ekstraintestinal olduğu düşünülebilir.[98-100]

PFGE profilleri, soy içi genetik varvasyonun çok daha yüksek seviyelerini göstermiştir.[101, 102]

Tüm *E coli* ST131 izolatları, diğer bir çok *E coli* gibi fimH genine sahiptir FimH tipleme bölgesi (fimHTR) oldukça çeşitli allel bölgesi taşır. ST131 izolatlarını klonlamak için bu tipleme yöntemi filogenetiği kısıtlamak için uygulanmıştır [103, 104]. Adam Sapper ve ark. *fimH* alttipine göre en sık görülen 3 fimH türünün *Ecoli* ST131 izolatının %96'sını oluşturduğunu bulmuşlardır.[105] Klon ST131 izolatlarında *fimH* allellerinin çeşitliliği moleküler mekanizmaların altında yatan klonal çeşitliliği göstermektedir. CH klontipleme yöntemi *E coli* ST131'i tespit edebilmiş ve bu soyun bugüne kadar tanımlanmış iki serogrubunu O25b (fimH30) ve O16 (fimH41) ayırtetmiştir.[106]

Adezinler: mukozal yüzeye yapışmayı sağlayarak *E. coli*'nin epitel hüceye girişini kolaylaştırır. *E. coli* adezinleri mannoz varlığında hemaglütinasyonun devam edip etmemesine göre Mannoza dirençli ve mannoza duyarlı adezinler içermektedir.

P fimbria (pili) P fimbriaya (pili) sahip suşlar mannozdan etkilenmeyip üroepitelyal hücrelere aderensi sağlar. Kromozom üzerindeki patojenite adalarında pap (pyelonephritis associated pili) geninde kodlanır. Üst İYE'de en sık rastlanan ikinci virülans faktördür. P fimbria P kan grubu antijenlerini reseptör olarak tanır. P kan grubu antijenleri, terminal ya da internal α-D- galaktopiranozil (1-4) β-D-galaktopiranozil (Gal-Gal) molekülü içeren oligosakkaritlerden oluşmuştur. Bu antijen insanda glikoproteinlerde, *E.coli*'de bulunur. P fimbrialar eritrosit, insan mesane epitel hücresi ve musküler tabakaya tutunmayı sağlar. Özellikle piyelonefrit suşlarda sıkça bulunur. Gal-Gal reseptörleri ile üriner sistem epitelyum hücelerine bağlanır.

Mannoza duyarlı adezinlerden **tip 1 pili** aderensi, Fim geni tarafından kodlanır. En sık rastlanan virülans faktördür. Genelde sistit ve pyelonefrit olgularından izole edilmektedir.

Bakterilerin hareketliliği ve üropatojenik **toksinler**, üst üriner sisteme ulaşmayı kolaylaştırır.

Kapsüler polisakkarit; komplemanın litik etkilerinden ve fagositozdan korur (K kapsül gibi)

2.10.2.1. Toksinler

Hemolizin Sitolitik protein yapılı ekzotoksindir ve a-hemolizin olarak adlandırılır ve **hly** geni tarafından kodlanır. Hücrede porlar oluşturarak lizise sebep olur. Böylece doku invazyonunu kolaylaştırır ve renal tübüler epitelyal ve parankimal hücre hasarına neden olur. Böbrek hücrelerinde sitokin salgılanmasını, süperoksit üretimini ve ATP seviyelerinin düşmesini uyarır.

2.10.2.2. Sideroforlarla demir kazanımı

Bakteriler demir bağlama kapasitesini arttıran mekanizmalardan sideroforları, canlılığın devamı ve dokulara yayılmada kullanır.

Aerobaktin demir miktarının kısıtlı olduğu mesane gibi yerlerde bakterinin demir ihtiyacını karşılayan demir bağlayıcı proteindir [107].

Blanco ve ark. *E. coli* ST131'de farklı virülans faktör (VF) profillerini karakterize eden birkaç VF-kodlayan gen (*afa* (Afa / Dr adezyonu), *iroN* (katekolamitrofor reseptörü), *ibeA* (beyin endotelinin invazyonu) ve *sat* (salgılanan ototransporter toksini) VF profilleri "virotipler" olarak tanımlamışlardır. VF kodlayan genlerin dağılımına göre A, B, C ve D dört virotip bulunur.[108]

A ve B virotipleri, çoklu ilaç direnci, CTX-M-15 ve plazmid aracılı kinolon direnci (*aac(6 ')-lb-cr) taşıdığı,* virotip C'nin ise, en yaygın *E coli* ST131 virotipi olup daha yüksek enfeksiyon sıklığı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.[108]

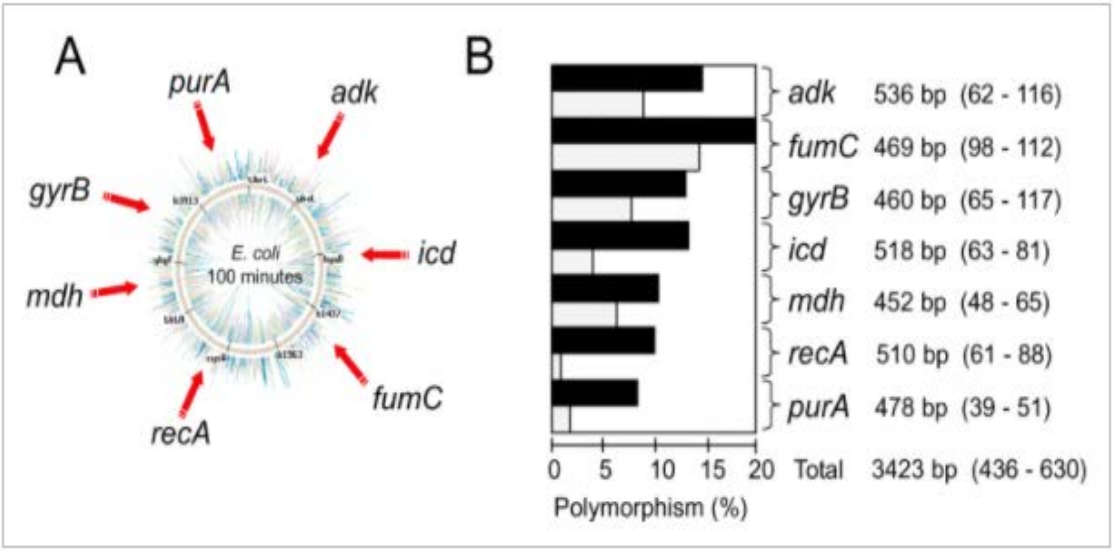
Non ST131gup B2 ExPEC'de afa/draBC (Afa/Dr adhezinleri kodlayan), papG (P fimbrial adhezin), toksin genleri (cnf1ve hlyA) bazı virülans faktör genleridir.[109]

Tablo 2.3. *E coli* ST131 arasında virotipleri ayırt etmek için VF kodlayan gen şeması [108, 110].

Virotype	*afa/draBC*	*afa* operon	*iroN*	*sat*	*ibeA*	*papGII*	*cnf1*	*hlyA*	*papGIII*	*cdtB*	*neuC*-K1
A	+	+	–	+/–[c]	–	–	–	–	–	–	–
B	–	–	+	+/–[c]	–	–	–	–	–	–	–
C	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
D	+/–	+/–	+/–	+/–	+	–	+/–	+/–	+/–	+/–	+/–
E	–	–	–	+	–	+	+	+	–	–	–

+ pozitif PCR, - negatif PCR sonucu.

ST131 izolatları içindeki O16 ve O25b serotipleri, Pasteur Enstitüsü MLST şemasına göre tanımlanmıştır. Achtman tarafından *E coli* ST131 izolatlarının 7 housekeeping gen dizileri adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA ve recA'ya sahip olduğu MLST lokusunda tanımlanmıştır. Ancak Pasteur tarafından tanımlanan dinB, icdA, pabB, polB, putB, trpA, trpB ve uidA 8 MLST lokus analizinde küçük çeşitlilik bulunmuştur.[94]



Şekil 2.11. *E. coli* kromozomu etrafına dağılmış 7 housekeeping genlerinin fragmanları

2.10.3. *E coli* ST131 Klonunu tespiti için tarama yöntemleri

Clermont ve ark. tarafından geliştirilen multiplex PCR yöntemleriyle grup B2'ye bir *E coli* izolatı atadıktan sonra, diğer tek nükleotid polimorfizm (SNP) tabanlı yöntemler, ilgili izolatın ST131soyuna aitliğini belirlemek için kullanılır.[111] *Rbf* lokusunun 5′ kısmının spesifik-allel PCR'ı yaygın O serogrupları (O25b'ye özgül allel dahil) tespit edilebilir.[112] Achtman ve Pasteur Enstitüsü tarafından tasarlanan

yöntemler MLST'de kullanılan genlerin "ST131-spesifik" allellerini kullanır. Clermont ve ak. Pasteur Enstitüsü MLST yöntemindeki ***pabB*** geninin **SNPlerinde** PCR tabanlı spesifik bir allel ST131'i tanımlamışlardır.[89] Weismamm ve ark. (Achtman MLST yöntemi) ST131 *E. coli* alt klonları, *fumC* geninin ST131 ile ilişkili SNP'sinin kullanımını önermişlerdir. Bu metod CH klontipleme olarak bilinip, idrar örneklerini doğrudan test etmede başarıyla kullanılmıştır. Açıklanan yöntemlerin en uygunu CH klontipleme yöntemi görünür. ST131 soyun iki serogrubunu belirleyebilmiştir. O25b (fimH30) ve O16 (fimH41).[101, 113]

Blanco ve ark. 2 triplex PCR önermiş, biri CTX-M-15 üreten (O25b *rbf* aleli) *E. coli*'nin ve virotip A' ya özgü bir VF gen, *afa/draBC* genini içeren, diğeri virotip B, C ve D'ye özgü virülans faktör genlerin (sırasıyla *iroN, sat* ve *ibeA*) tespitine dayanmaktadır. [108]

2.10.4. *E. coli* ST131 Genomiği

On üç *E. coli* ST131 suşunun tüm genom sekansları şu anda mevcut olup, Avasthi ve ark. 2011'de, Batı Hindistan'daki Pune şehrinden tipik bir üropatojenik *E. coli* ST131 izolatı olan NA114 suşunun kromozom sekansını ve bu suştaki tek 3.5 kb plazmidin sekansını yayınlamıştır. NA114 kromozomu, % 51.16 GC içeriği ve% 88.4 kodlama yüzdesi ile 4.935.666 bp uzunluğunda, 4,875 protein kodlama dizisine, 67 tRNA'ya ve üç rRNA genine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Son zamanlarda *E. coli* ST131'in epidemik ve yüksek derecede virülan CTX-M-15 üreten H30-Rx alt klonunun temsilcisi olarak kabul edilen üropatojenik bir suş olan JJ1886 suşunun tam genomunda, % 50,8 GC içeriğine, 5,086 protein kodlama sekansına, 88 tRNA genine ve ayrıca 1,6, 5,2, 5,6, 56 ve 110 kb boyutunda beş plazmide sahip 5,129,938 bp'lik bir kromozoma karşılık geldiği tespit edilmiştir. Bu genom dizisi için çok az analitik veri bildirilmiştir. Ancak yalnızca en büyük plazmidin (110 kb) antibiyotik direnci için genler taşıdığını belirtmişlerdir. Bla CTX-M-15 geninin, tamamlanmamış bir Tn3 elemanının lambda benzeri bir profaja sokulmasıyla JJ1886 kromozomuna entegre edildiği bulunmuş. NA114 ve JJ1886 suşları için daha fazla analiz gereklidir.

Totsika ve arkadaşları. İngiltere'nin kuzeybatısında CTX-M-15 üreten ST131 izolatlarının temsili bir örneği olan EC958 suşunun genom dizisini belirlemiştir. Bu suşun tam genomu, 5,070,614 bp'lik bir kromozomun yanı sıra 134 kb ve 4 kb

büyüklüğünde iki plazmid içermekte olup, en küçük plazmit, ortak grup B1 *E. coli* suşu na benzerken, bla CTX-M-15'i barındıran en büyüğü, pEK499'a yüksek düzeyde özdeşlik sergiler. [2]

2.11. ST131 *E coli*'nin Antibiyotik direnci

ST131 suşlarının en yaygın grubu, FQ'lara direnç ve tip 1 fimbriae fimH30 alleline sahip olma ile tanımlanır.

Tüm kıtalararası *E. coli* ST131 izolatlarında GSBL CTX-M-15 üretiminden kaynaklanan geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç ve florokinolonlara direnç ortak iki özellik olarak sıkça tanımlanmıştır. GSBL üretmeyen, florokinolona dirençli *E. coli* izolatları da ST131 klonunun yüksek prevalansını sergilemiştir.

GSBL üreten ST131 *E. coli* izolatları dikkate alınan ülkeye bağlı olarak, amikasin, amoksisilin/klavulanik asit, piperasilin/tazobaktam, veya siprofloksasine ST131 olmayan *E. coli*'ye göre daha dirençli ve gentamisin ve cotrimoksazole daha sık daha duyarlı oldukları görülmüştür.

E.coli ST131 izolatları sistematik olarak kinolonlara/florokinolonlar ve ampisilin/amoksisiline ST131 olmayan *E.coli* izolatlarına göre daha sık dirençli olduğu bildirilmiştir.[2, 101]

GSBL üreten *E coli* ST131 FQ, ampisilin/amoksisiline direnç, TEM-1, OXA-1genler IncF tipi plazmidler üzerinde CTX-M geni ile ilişkili bulundu. Dünya çapında CTX-M üreten *E coli* ST131 izolatlarının ataları *Ecoli* ST131, FQ dirençli ve IncF aracılı TEM-1 ve/veyaOXA-1 olabilir.[2, 101]

2.11.1. Biyofilm üretimi ve metabolik potansiyel

E. coli ST131 izolatlarının biyofilm üretimiyle çok az çalışma vardır. Biyofilm oluşumunun ilk adımı fimbrial bağlanmadır. Biyofilm üretimi bakteriyi antibiyotik etkisinden korur ve dirence katkıda bulunur. Virülans faktörleri, özellikle modifiye edilmiş FimH, dirençli fenotip ve ST131 izolatlarının hızlı yayılması, bu klonu oldukça patojenik hale getirir ve etkisiz tedaviye neden olur.

Clermont ve arkadaşları 2 suşun 48 saat içinde biyofilm ürettiğini, Kudinha ve arkadaşları ST131 *Ecoli*'nin non ST131 *E.coli* izolatlarına göre biyofilm üreten izolatların prevalansının daha fazla olduğunu bulmuşlardır.

Vimont ve arkadaşları ST131'in 3 set kültür koşulunda; Bir zengin ortam ile iki glukonat veya glikoz içeren iki minimal ortamda maksimum büyüme oranını (MGR) ölçerek sindirim sistemini kolonize etme kapasitesini araştırmışlardır. Kommensal *E. coli* ve iki ExPEC suşuyla karşılaştırdıklarında ST131 suşunun diğer 3 suştan daha yüksek MGR'ye sahip olduğunu bulmuşlardır. Veriler *E. coli* ST131'in yüksek metabolik potansiyele sahip olduğunu muhtemelen bağırsak kolonizasyonu oluşturma ve sürdürme yeteneğini artırıp üroptojeniteye yönelmeyi göstermektedir.[101]

2.12. *E coli* ST131 izolatlarının plazmid karakterizasyonu

Farklı *Ecoli* ST131 izolatlarında çeşitli plazmidler (Inc), konjugatif transfer, boyut, replikon türleri ve bla genleri karakterize edilmiş. IncF plazmidleri, virülans ve antimikrobiyal direnç belirleyicileri ile bakteriyel fitnessa katkıda bulunur.

Bileşik krallıktaki A suşu plazmidi pEK499, FII ve FIA iki replikon füzyonu ile 25 kb'lık bir bölgede 8 farklı antibiyotik sınıfına dirençte tahmin edilen 185 gen barındırıyordu.

Bu 25kb bölgede direnç kazandıran genler; aminoglikozide (amikasin ve tobramisin) ve siprofloksasine (*aac*(6´)-*ıb*-*cr*), makrolidler *mph* (A*), kloramfenikol* (*cat*B4), tetrasiklin (*tet*A), 1.8 kb'lık class I integronda ise trimetorprim (*dfr*A7), streptomisin (*aaad*AS) ve sulfonamid (*sull*) direnci veren genlerle blaCTX-M-15 ve blaOXA-1'i birlikte içermekteydi.

ST131 ile ilişkili plazmidlerden *Enterobacteriaceae* ile sınırlı IncF plazmidleri genelde birden çok füzyon veya replikon içerir. Homojen plazmid grubu olmayıp uzunluğu 100kb'dan büyük, kopya sayısı düşük, sıklıkla virülans ve antimikrobiyal direnç genlerini taşımaktadır [114, 115]. IS26 ekleme elemanları aracılığıyla *bla*CTX-M-15 içeren gen kasedini almıştır.

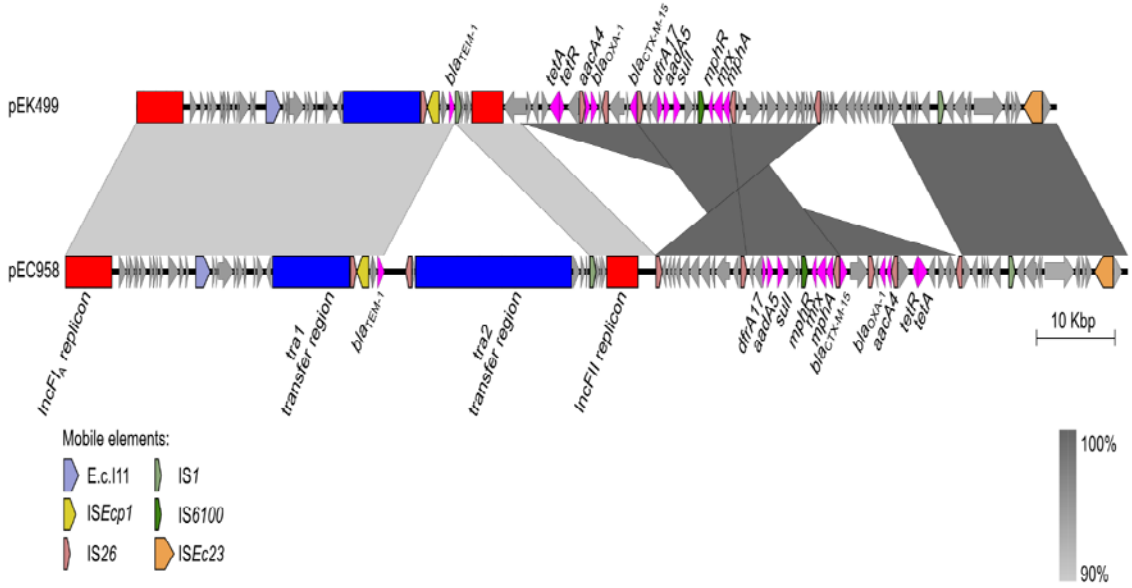
ST131'de *Inc*F olmayan plazmidler de vardır. Farklı türlerden oluştuğu bilinen plazmidler IncA/C, IncL/M ve IncN'yi içerir [97, 116]. ST131'de FQ direncinden sorumlu ikinci gen *par*C'dir. *gyr*A ve *par*C mutasyonları büyük olasılıkla rekombinasyon ve dikey olarak iletilmektedir.[117]

ST131'in virülans potansiyeli ile ilgili çelişkili kanıtlar vardır. Virülans genleri tipik olarak plazmidler ve genomik adalar gibi mobil genetik elementlerin hareketinden

dolayı aksesuar genom ile ilişkili olup tür içi ve türler arası varyasyona katkı sağlamaktadır.[97, 118]

Birleşik devletlerde pEK516 plazmidi IncFII'ye aittir.103 tahmini gen 7'si 22kb'lık bölgede antibiyotik direnci verir. *bla*CTX-M-15, *bla*OXA-1, *bla*TEM-1, aac(6´)-Ib-cr, aac(3)-II (gentamisin direnci, *catB*, *tetA*, sınıf I integron (sulfanamidler, trimetorprim, streptomisin direnci), pEK516'da blaCTX-M-15'ten yukarı akışta ISEcp1 ögesi 48 bp, pEK499'da ise 24bp ISEcp1kalıntısı IS26 tarafından kuşatılmış. Bu iki plazmidin DNA sekans özdeşliği %75'dir[101, 119].

pEK516 ve pEK499 çoklu dirençli izolatlardır. Bileşik krallık'ta Belfasttaki pEK204 suşu sadece 2 direnç geni blaCTX-M-3 ve blaTEM1taşır. Bileşik Krallık'ta 2005 yılında toplum kaynaklı İYE O25b:H4 serotip suşu EC958'in birkaç genom dizisi şekil 2.12'de gösterilmiştir.



Şekil 2.12. ST131 izolatlarından iki IncF plazmidi pEK958 ve pEK499'un sekans karşılaştırılması

İki replikon RepFIA ve RepFII ve 12 Antibiyotik direnç genini barındıran 135.6 kb plazmid (blaCTX-M-15 dahil).[10]

pEK516suşu Kanada suşu CTX-M-15 üreten ST131 pC151A'ya benzer kabul edilebilir. Dhanji ve ark. Fekal CTX-M-15 üreten *E coli* ST131 izolatlarındaki pllazmidleri karakterize etmek için Billeşik krallığa yurtdışından dönen yolculardan fekal örnekle alınmış izolatların %62'si blaCTX-M-15, pEK516 ve pEK499 plazmidleri

içermekte olduğunu saptamıştır. pEK499 pazmidinin hepsi Hindistandan dönen bireylerden elde edilmiştir.[101, 119]

2.13. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz zincir Reaksiyonu (PCR), herhangi bir organizfmaya ait DNA'daki istenen bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan moleküler biyolojide en fazla tercih edilen yöntemdir. PCR yöntemi 1980'lerde Kary Mullis tarafından tasarlanarak 1987'de bu ismi almıştır.

Nobel Ödüllü Arthur Kornberg ve arkadaşları 1956 yılında *E. coli'de* "DNA polimeraz 1" enzimini keşfetmişlerdir. Bu keşif DNA'nın kendini nasıl eşlediğinin anlaşılmasına yol açmıştır. Oligonükleotit (kısa DNA parçaları) sentezi çalışmalarında DNA sentezinin laboratuvar ortamında PCR'ın 3 ana basamağında DNA polimeraz ile farklı sıcaklıklardaki üç olayın özenle kontrolüyle tekrarlanacağı keşfedilmiştir.[120]
Kary Mullis, Michael Smith ile Nobel Kimya Ödülü'nü 1993'te alarak PCR'ın moleküler biyoloji ve tıpta büyük ivme kazanmasını sağlamıştır. Ancak DNA dizisinin büyütülüp ardından ürünün nicelleştirilmesinin son derece zor olması PCR yönteminin bazı ciddi sınırlamalarıydı. Bu sınırlama 1992'de Higuchi ve arkadaşları tarafından gerçek zamanlı PCR geliştirilmesiyle çözüldü.[121] Termofilik bakteri 1976'da Thermus aquaticus'tan Taq polimeraz enzimi keşfedildi. Bu enzim PCR'daki yüksek sıcaklıklara (95°C) dayanabilen bir enzim olup stabil DNA polimerazdır. Isıya hassas olan DNA polimeraz yerine oldukça dayanıklı tüm döngüler boyunca verimli DNA sentezi yapacak Taq polimeraz 1986'da kullanılmaya başlamıştır. PCR'de ısıtma ve soğutma için termal döngü 1987'de icat edildi. PCR, primerler ve deoksinükleotid trifosfatların (dNTP'ler) aracılık ettiği ve DNA polimeraz tarafından katalize edilen DNA dizilerinin enzimatik bir amplifikasyonudur.[122]

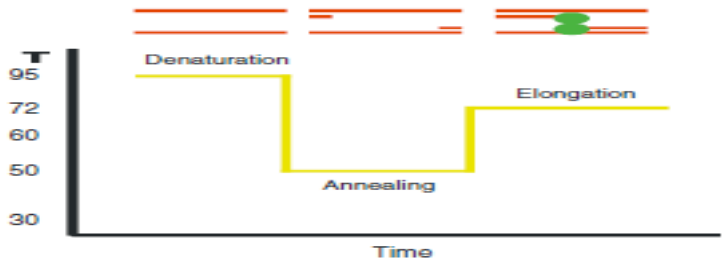
2.13.1. PCR Optimizasyonu

Örneklerde inhibe edici maddelerin varlığı, kontaminasyon riski buna bağlı olarak yanlış pozitiflik, bileşenlerin miktarının yanlış kullanılması, sıcaklık parametrelerinin ayarlanamaması PCR'da karşılaşılabilecek sorunlardır.[123]

2.13.2. Real time PCR'ın temelleri

2.13.2.1. PCR Amplifikasyonu

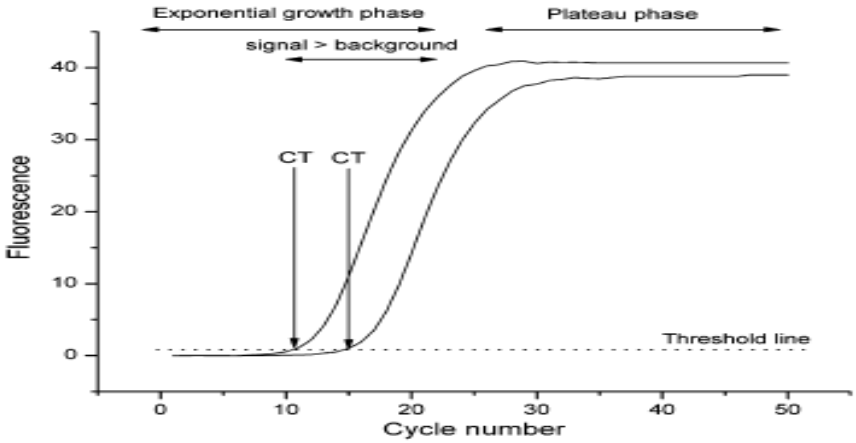
PCR, tek veya çift sarmal DNA şablonu üzerinde gerçekleştirilir ve DNA sekansına uygun iki oligonükleotit primer güçlendirilmiş dört adet deoksinükleotid tri fosfat (dNTP'ler), ısıya dayanıklı bir polimeraz ve tampondaki Mg^{+2} iyonları gereklidir. Çift sarmal DNA'yı ayırmak için yüksek sıcaklık uygulanır. Primerlerin şablona bağlanması için sıcaklık düşürülür. Polimeraz enzim için optimum sıcaklık 72°C civarına ayarlanır.



Şekil 2.13. PCR sıcaklık döngüsü 1) çift zincirli DNA'daki bağları eritmek için sıcaklık 95°C'ye yükseltilir.2) Sıcaklık, primerlerin eşlenmesi için düşürülür. 3)Polimerazın primerleri uzatmasına izin veren sıcaklık değeri 72°C'ye ayarlanır. M. Kubista et al. (2006)

2.13.2.2. PCR'ın gerçek zamanlı izlenmesi

Real time PCR, çift sarmallı bir DNA içinde araya giren ve floresan yayan floresan boyanın varlığında gerçekleştirilir. PCR sırasında, amplikonların (çift sarmallı DNA) sayısındaki artış, gerçek zamanlı ölçülebilen floresans miktarındaki artışla ilişkilidir. Floresan boyalar diziye özel olmayıp uyumsuz iplikler, primer dimerler ve spesifik olmayan amplifikasyondan parçalar herhangi bir çift iplikli DNA ile ara katman oluşturabilirler. Gerçek zamanlı PCR, oluşan ürüne bağlanan bir floresan raportöre ihtiyaç duyar ve varlığını floresan ile bildirir. Başlangıç döngüleri sırasında sinyal zayıf olup ayırtedilemez. Amplifikasyon yanıt eğrilerinin reaksiyonun büyüme fazında paralel olması beklenir.



Şekil 2.14. Bir Threshold (eşik) seviyesi, arkaplanın yeterince üzerinde ayarlanmış ve eşiğe (threshold) ulaşmak için gereken döngü sayısı (CT) gösterimi.

Farklı cihaz yazılımları, threshold'u (eşik) seçmek için farklı yöntemler ve algoritmalar kullanır, hatta kullanıcının bunu manuel ayarlamasına izin verir. [122, 124]

2.13.2.3. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ve Üç Temel Basamağı

PCR, nükleotitlerin uygun koşullarda tüpte çoğaltılması işlemidir. Belli bir DNA parçasının kopyalarının iki primerle sınırlandırılan genin, enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır.

2.13.2.3.1. Denatürasyon

94-98°C, 20s-1dk. yüksek sıcaklıkta, DNA'nın iki zinciri arasındaki tamamlayıcı bazları birbirine bağlayan hidrojen bağları çözülerek tek sarmal hale gelmesidir.

2.13.2.3.2. Primer eşleşmesi , Bağlanma (Annealing, hibridizasyon)

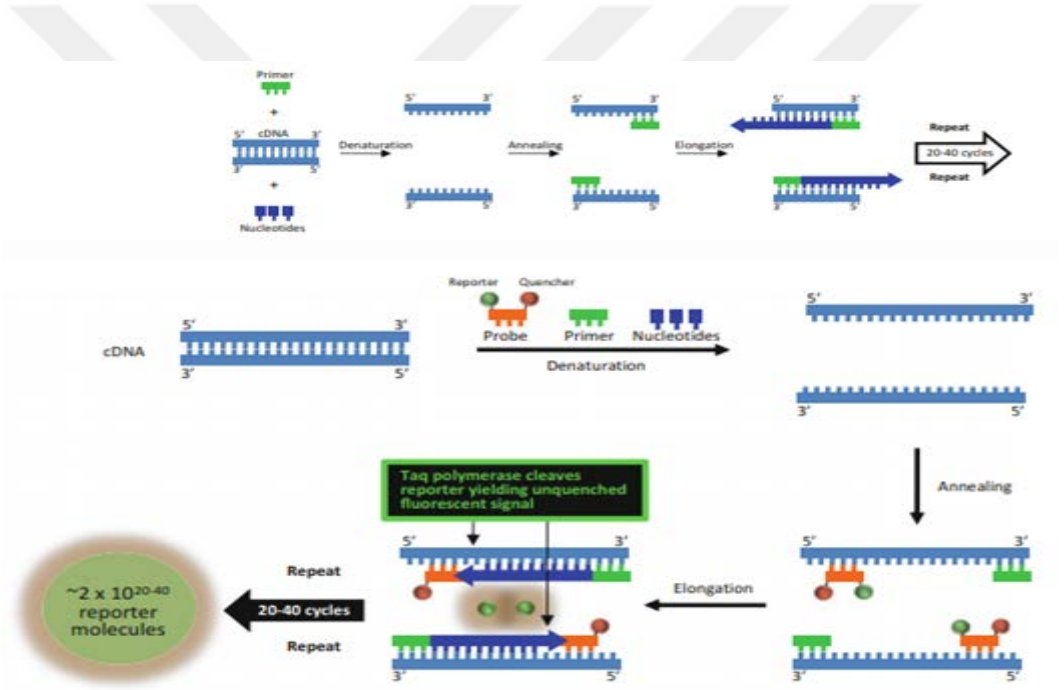
Ayrılan kalıp DNA zincirleri tekrar birbirine bağlanmaz. Primerler derişimlerinin yüksek oluşu, kalıp DNA'ya göre çok küçük olup hareketlerinin hızlı olması, özgül olarak tanıdıkları kalıp DNA'ya bağlanma olasılıklarını arttırır. Sıcaklığın düşmesiyle (37–65°C 30 s-1 dak.) oligonükleotid yapılı 2 primer (Forward ve reverse primerler) çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizilerle tek sarmallı hedef DNA' ya bağlanır. Bağlanma yaklaşık 55°C' de gerçekleşir. polimeraz enzimi, primer-DNA şablonuna bağlanır ve DNA sentezi başlar. (Primerlerin annealing derecelerinin

hesaplanması ise Tm= 2°C (A+T) +4°C (G+C) sonucu şeklindedir) Primer boyutu genelde 18-22 bp arasındadır. Daha düşük sayıda primer üretilirse primerin özgüllüğü azalır, yükseltilirse de primerin kalıp DNA'ya bağlanması güçleşir.

2.13.2.3.3. Primer uzaması, uzama (Elongation, Extension, polimerizasyon)

DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklığa getirildiğinde (72°C)primerlere bağlanmış olan enzim molekülleri, Mg^{+2} iyonları vasıtasıyla katalizör görevindeki DNA polimeraz primerin serbest 3´ hidroksil (OH) ucuna ortamdaki dNTP'ler getirilerek 5´-3´yönünde dNTP'ler ekleyerek yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır.

PCR metodu; Çoğaltılmış ürün miktarı bu üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır (30-40 döngü).



Şekil 2.15. Real Şekil: Real time PCR'ın şematik diyagramı [125]

2.14. Yüksek çözünürlüklü erime sıcaklığı (Tm) veya erime eğrisi analizi

DNA'nın temel termodinamik özelliğine dayanır. Wittwer ve ark.1997'de LightCycler'ı geliştirdi. Erime analizi, dsDNA boyalar, problar (iki floresans rezonans transfer boya) kullanılarak ikili hibridizasyon gerçekleştirilir.

Ririe ve arkadaşları DNA erime eğrilerinin analizi ile PCR ürünü farklılaşmasını bildirmiştir [61] DsDNA'ya özgü boyanın floresansını izlediler. SYBR Green I ve floresans grafiğini çizerek elde edilen DNA erime eğrileri, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak gösterildi.[126]

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Mikrobiyolojik ve Moleküler Yöntemler

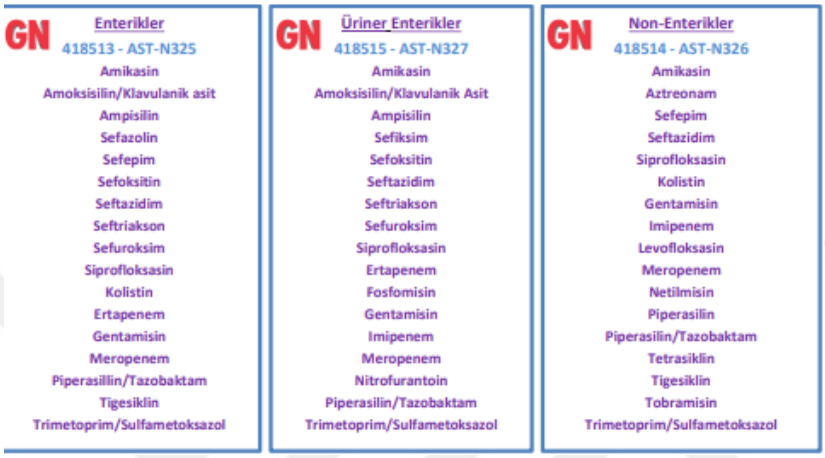
Çalışmamızda, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez laboratuvarında 17.4.2019-21.7.2019 tarihlerinde toplam 1262 *E. coli* izole edilmiş olup 619'u (%49.1) GSBL pozitif iken 643'ü (%50.9) GSBL negatifti. GSBL direnci saptanan 100 suş çalışmaya alındı. GSBL üreten suşların birden fazla izole edildiği hastaların tespit edilen ilk atakları dikkate alınıp tekrar izolatlar elimine edildi. Standart laboratuvar bakteriyel yöntemlere göre belirlenen idrarda $\geq 10^5$ cfu/mL üreyen *E. coli* suşları çalışmaya alınmıştır. İzolatların tür tanımlaması Vitek 2 otomatize compact (Biomerieux, France) ile GNI (Gram negatif basil tanımlama) kartı kullanılarak gerçekleştirildi. Vitek 2 sisteminde GSBL pozitif *E. coli* suşlarına çift disk sinerji testi uygulandı ve her iki yöntemle de pozitif bulunan 85 suş çalışmaya dahil edildi. İdrarda tanımlanan GSBL pozitif 85 *E. coli* izolatı "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) kriterlerine göre değerlendirildi. Antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında *E. coli* ATCC 25922 kontrol suşu kullanıldı.

GSBL'nin varlığı için fenotipik testler uygulanırken GSBL tipinin karakterize edilmesinde moleküler yöntemler kullanıldı. GSBL'leri kodlayan genler (blaCTX-M-3, blaCTX-M-15 Real time PCR ile değerlendirildi. Fenotipik pozitif GSBL üreten suşlar ayrıca ST131 klonun varlığı için PCR ile araştırıldı.

3.2. Antimikrobiyal Duyarlılık testi ve Geniş Spektrumlu β-laktamaz (GSBL)

3.2.1. VİTEK 2 COMPACT

Vitek 2 ID ve AST Kartları



VİTEK 2 otomatize compact (BioMerieux Vitek Systems, France) ile izolatların identifikasyonu, duyarlılıkları ve GSBL üretimi değerlendirildi.

Bakteriyoloji laboratuvarımız Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı (CAESAR) ağına dahil olup, antibiyotik duyarlılık sonuç bildirimlerinde "kısıtlı bildirim" standartları kullanılarak yorumlanmaktadır.

3.2.2. Çift Disk Sinerji Yöntemi

Vitek 2 sisteminde GSBL pozitif suşlara Çift Disk Sinerji Testi uygulandı. Burada 0.5 McFarland *E. coli* bakteri inokulumu Muller Hinton agar (MHA) besiyerine yayıldı. MHA besiyerinin merkezine amoksisilin/klavulanik asit diski ve bu diskin 20 mm uzağına sefoksitin, cefotaksim, seftazidim diskleri (Becton- Dickinson, ABD) yerleştirildi. 18-20 saat inkübasyon sonunda üçüncü kuşak sefalosporinlerin amoksisilin/klavulanik diskine doğru inhibisyon zonunda genişleme görülmesi, GSBL pozitifliği olarak değerlendirildi.

3.3. DNA İzolasyonu

3.3.1. CTX-M β-Laktamaz Genleri ve ST131 Klonunun Araştırılması

Öncelikle -20°C'de saklanan bakteriler oda sıcaklığına getirildi, üretilmesi için kanlı besiyerine (COS) ekim yapıldı. Besiyerinden alınan 1 koloni (200 µl bakteri), 200µl Fosfat tamponlu salin (PBS) ile karıştırıldı. High Pure nükleik asit saflaştırma kiti ile spin-kolon temelli santrifügasyon prosüdürü kullanılarak amplifikasyon için kalıp DNA açığa çıkarıldı.

Gerekli malzemeler:

Malzemeler	**Kullanım Amacı**
Proteinaz K (20 mg/ml)	DNA izolasyonunda proteinleri parçalayan proteaz.
Lizozim	Hücre duvarındaki polimerik bileşikleri parçalar(peptidoglikan tabakadaki muramik asit arası bağları kırar.)
İzopropanol	DNA çöktürülmesinde kullanılır.
Saf etanol	DNA'nın çöktürülüp saflaştırılması
Bağlama Tamponu (Binding Buffer)	Açığa çıkan DNA'nın silika membrana bağlanmasını sağlar.
Yıkama Tamponu (Wash Buffer)	DNA'yı kolondan ayırmadan, diğer moleküllerin uzaklaştırılmasını sağlar.
Ayrıştırma Tamponu (Elution Buffer)	DNA'yı kolondan ayırır.
Spin kolon	DNA moleküllerinin bağlanabileceği silika membran yapı
Toplama tüpleri	Santrifüj sonrası kolondan süzülen sıvıları toplar.
Isı bloğu	Deney tüpü içindeki reaksiyonu istenilen sıcaklıkta inkübe eder.
Mikro-santrifüj	Numunenin ayrıştırılması ve konsantre edilmesinde kullanılır.
Vorteks	Yüksek çeviri gücüyle tüpteki reaktifin çökmesini sağlar.

3.3.2. Örnek lizisi ve DNA bağlanması

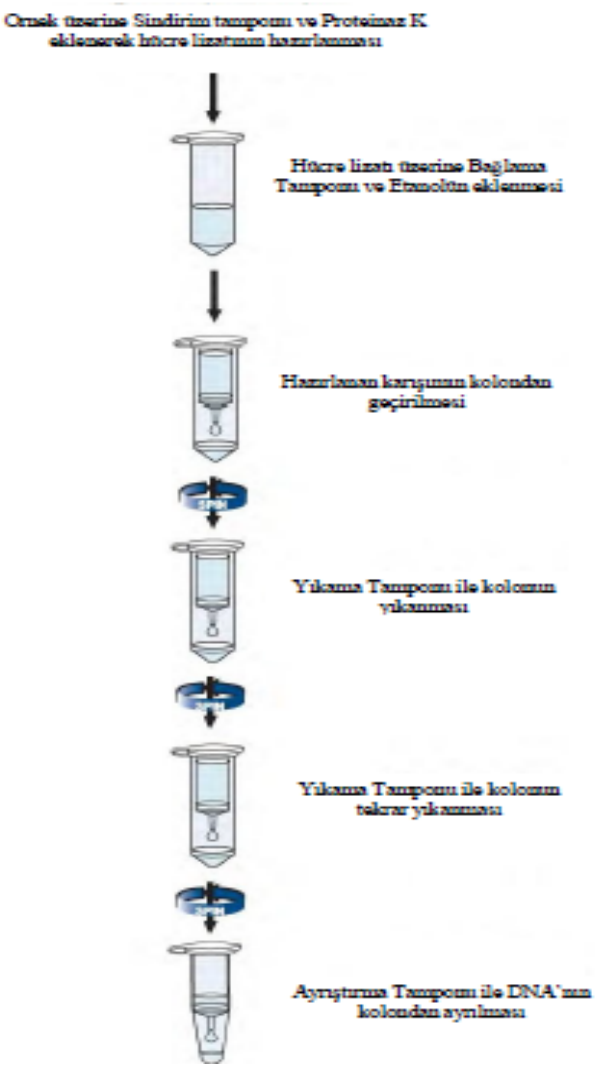
spin-kolon temelli santrifügasyon prosedüründe çok az miktar örnekten yüksek miktarda ve saflıkta DNA elde edilebilmektedir. Öncelikle hücreler sindirilerek hazırlanan lizat kolondan geçirilir ve DNA'nın kolona bağlanması sağlanırken, istenmeyen moleküller yıkanarak kolondan uzaklaştırılır. En son genomik DNA kolondan ayrılır (elüe edilir) ve ependorfta toplanır.

Kitin içinden çıkan Taq DNA polimeraz enziminden 10 µl alınıp, reaksiyon mix SYBR Green I ile karıştırıldı. Böylece PCR reaksiyon mixi (Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, dNTP mix, SYBR Green I boya ve $MgCI_2$), kullanıma hazır hale gelince, primerler, H_2O, $MgCI_2$ hepsi vortekslendi ardından spin yapıldı. Primerler 250 µl su ile sulandırıldı.

Ekstraksiyona başlamadan önce, ependorfa hasta sayısı x 200 µl Elüsyon tamponu (10mM Tris-HCL, pH 8.5) koyup ısı bloğunda + 70 °C'de ısınması sağlandı.

Ependorflara 200 µl PBS eklendi ve 200µl bakteri *(E. coli* pasajından 1 koloninin süspanse edilmesi) karıştırıldı. Beş dakika 3000 g de santrifüj edildi. Böylece bakteri çöktürüldü. Santrifüj sonunda ependorflara 5 µl lizozim enzimi ekleyerek pipetajlandı. 37 °C'de 15 dk. inkübe edildi. Daha sonra üzerlerine 200 µl bağlama tamponu (6M guanidin-HCL, 10 mM ürea, 10mM Tris-HCL, %20 Triton X-100, pH 4.4), 40 µl Proteinaz K konulup pipetajlandı ve ısı bloğunda + 70°C'de 10 dk. inkübe edildi. Nükleik asitlerin saflaştırılması ve inhibitörlerin uzaklaştırılması aşamasında High Pure saflaştırma kitleri (Roche) ile spin-kolon yöntemleri kullanıldı. İnkübasyondan sonra örnekler üzerine 100 µl isopropanol ekleyip vortekslendi. Beş dk. 13.000 g'de santrifüj edildi. Bu arada toplama tüpleri içine high püre filtreli tüpler yerleştirip kapaklara numara verildi. Toplam karışımı (numune, binding buffer, proteinaz K, isopropanol) 545 µl filtreli tüplere ekleyip 1 dk. 8000 g' de santrifüj yapıp alltaki tüpü atıp yerine yeni tüp konuldu. Filtreli tüpün üzerine 500 µl İnhibitör Removal tamponu (5M guanidin-HCL, 20mM Tris-HCL, pH:6.6, 20 ml etanol hazırlandı) ekleyip 1 dk. 8000 g'de santrifüj sonunda alltaki tüp atılıp yerine yeni tüp konuldu. Filtreli tüpün üzerine 500 µl yıkama tamponu (20mM NaCL, 2mM Tris-HCL, pH:7.5 80 ml etanol) ekleyip 1 dk. 8000 g'de santrifüj edilip alttaki tüp atılıp yeni tüp konuldu. Bu işlem bir sonraki aşama da yine tekrar edildi. Alttaki tüp atılıp yerine yeni tüp konulduktan sonra 13000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. 1.5 ml ependorflar alınarak üzerine

numara yazıldı. Filtreli tüpü bu ependorfun içine koyup üzerine daha önce ısıttığımız (+70 °C) 200 µl Elüsyon tamponu koyup 1 dk. 8000 g'de santrifüj edildi. Spin kolon yöntemiyle nükleik asitler santrifüjle bir membran filtreye tutturularak saflaştırılmış oldu.



Şekil 3.1. Spin kolon temelli DNA izolasyonu

3.3.3. Nükleik asit kantitasyonu

DNA ekstraksiyonundan sonra **DNA miktarı** 260 nm'deki optik yoğunluğun ölçümü ile tespit edildi. DNA kalitesi nanodrop (Thermo, USA) spektrofotometre ile ölçülerek saflık kontrolü yapıldı. Yeterli saflıkta olmayan DNA ekstratları tekrar ekstraksiyon işlemine alındı. (Nükleik asitlerin saflığı A260/A280 olup, bu oranlar iyiyse nükleik asit kantitasyonuna geçildi.

DNA A260/A280 oranı 1,7-1,9 aralığında olmalıdır. Daha küçük değerler genelde protein veya organik kimyasal kontaminasyonudur. Bu orana uygun olan DNA örnekleri uzun süre saklanacağı için -20 °C'de muhafaza edildi

3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çalışmamızda spin kolon temelli santrifügasyon yöntemiyle izole edilen *E. coli* DNA'ları kullanıldı. GSBL pozitifliği nedeni beta-laktamaz enzim direncini kodlayan gen blaCTX-M-3 ve blaCTX-M-15 beta-laktamaz geni ve ST131 klonu varlığı Real-time PCR ile, Roche LightCycler 480 II termal döngü cihazı kullanılarak araştırıldı.

3.3.5. PCR Amplifikasyonu

3.3.5.1. BlaCTX-M-3 ve blaCTX-M-15 genin PCR Amplifikasyonu

E. coli'de β-laktamaz direncinden sorumlu mutasyonların belirlenmesi amacıyla blaCTX-M-15 geni, Hiran Dhanji ve arkadaşları (2010) tarafından tanımlanan yöntemlere göre amplifiye edildi. Hedef bölgelerin PCR amplifikasyonu için Tablo 3.1'de belirtilen primer çiftlerinin baz dizileri kullanıldı. [127].

Tablo 3.1. CTX-M 3 ve CTX-M-15 gen bölgesine ait primerler

Primer	**Dizi**	**Baz çifti (bp)**	**Kaynak**
BlaCTX-M MC-3-15F	5´-TGG GGG ATA AAA CCG GCA G-3´	49	Hiran Dhanji, 2010
BlaCTX-M MC-3-15R	5´-GCG ATA TCG TTG GTG GTG C-3´		

bp: Base pair baz çifti

Primerler; **MC-3-15F** (5´-TGG GGG ATA AAA CCG GCA G-3´) ve

MC-3-15R (5´-GCG ATA TCG TTG GTG GTG C-3´)

Primerler, grup 1 CTX-M genleri arasında korunan bir 49-bp bölgeyi amplifiye etmek için tasarlanmış. Amplikon, blaCTX-M-15, -28, -29, -32, -52, -57, -62, -71, -79 ve -89'un guanine sahip olduğu, diğer grup 1 genlerinde adenin bulunduğu 725

pozisyonundaki SNP'yi içermekte olup bu durum CTX-M-15'de daha yüksek bir erime sıcaklığına (Tm) yol açmaktadır.

-20 °C'de beklettiğimiz LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I kiti (Roche) kullanmak için kitteki 1a dan 1b ye 10 µl ekleyerek enzim 1b hazır hale getirildi. Primerlerin hepsi 250 µl su eklenerek sulandırma yapıldı. CTX-M 15 için kullanılan bir çift primerden aşağıdaki oranlarda eklenildi.

3.3.5.2. Master mix hazırlanması

BlaCTX-M genin amplifikasyonu için aşağıdaki şekilde miks hazırlandı.

DNA master mix	**Hacim**
Saf distile su	11.6 µl
F primer	0.3 µl
R primer	0.3 µl
Mg	1.6 µl
Enzim	2 µl

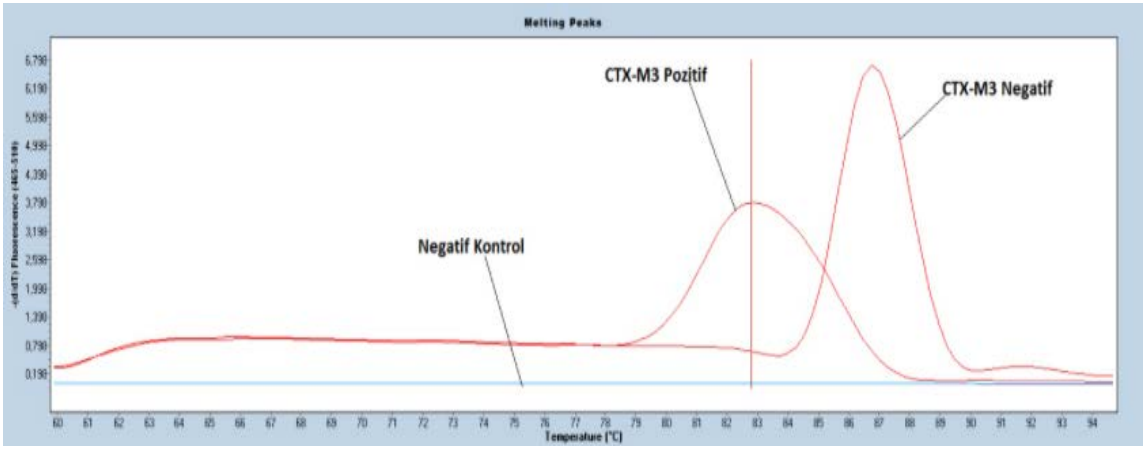
Yukarıdaki gösterilen kimyasallar -20 °C'deki dondurucudan çıkarıldı. Çözünen kimyasallar vortekslendikten sonra yukarıdaki gibi karıştırıldı. Hazırlanan master mix spin yapıldı. Kuyucuk başına 15 µl master mix eklendi. İlgili kuyuya örnek DNA materyalinden 4 µl eklenildi (toplam hacim 19 µl). CTX-M 15 pozitif kontrol suşundan ve negatif kontrol olarak hastanedeki GSBL negatif tüm antibiyotiklere hassas bir hastanın izolatından izole edilen DNA örneğinden 4 µl eklendi. Pipetaj yapıldı. Plate üzeri kapatıldı ve kısa süreli yaklaşık 10 saniye çalkalandı. Termal döngü cihazına yerleştirildi. CTX-M için Real-time amplifikasyon protokolü uygulandı.

3.3.5.3. Isı Döngü Proğramı

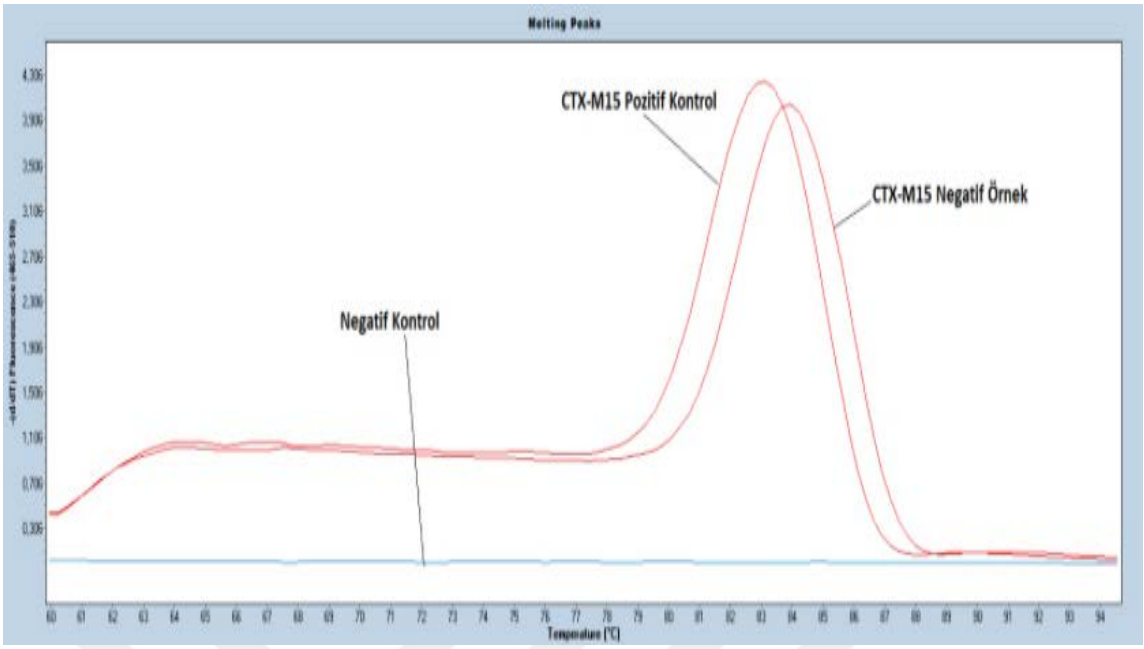
LightCycler 480 cihazı için termal döngüleyicinin sıcaklık profili aşağıdaki gibi programlanıp çalışma başlatıldı.

Basamak	Sıcaklık (°C)	süre	Siklus
Denatürasyon	95	10dk	1
Amplifikasyon (Quantifikasyon modu)	95	5sn	40
	58	10sn	
	72	10sn	
Melting curve **Tm** (Erime eğrisi modu)	95	10sn	1
	60	1dk	
	95	00:00	
Soğutma	40	30sn	1

LightCycler 480 II, SYBR Green 1 boyasıyla amplifikasyon sürecinde artan çift zincirli DNA (dsDNA) ile birleştiğinde floresan ışıma verir. Floresanın artışı gerçek zamanlı şekilde bilgisayar monitörüne yansıması izlendi. SYBR Green 1 bağlantılı floresan artışının spesifik DNA olup olmadığı, amplifikasyon süreci sonrası uygulanan melting curve analizi ile değerlendirildi. Elde edilen DNA'ların Tm (Temperature of melting-PCR ürünü erime sıcaklığı) dereceleri tespit edildi. Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak PCR sonucu elde edilen ürünün özgül ürün olup olmadığına karar verildi. Tm dereceleri aynı ise, aranan hedef bölgenin amplifikasyonu gerçekleştiği şeklinde değerlendirildi. Farklı Tm derecelerinde ise, özgül olmayan ürüne ait olduğu şeklinde yorumlandı.



Şekil 3.2. Real time PCR blaCTX-M-3 geninin erime eğrisi piki



Şekil 3.3. Real time PCR blaCTX-M-15 geninin erime eğrisi piki

3.3.5.4. ST131 Klonunun tespiti için primerler

PabB içindeki ST131'e özgü değişiklikleri içeren 40-bp (Timin "T" SNP) ve 49 bp (Adenin "A" SNP) bölgelerini amplifiye etmek için tasarlanan primer çiftleri (Şekil:3.2)[127]

ST131TF(5-GGT GCT CCA GCA GGT G-3´) ve ST131TR (5´-TGG GCG AAT GTC TGC-3´)

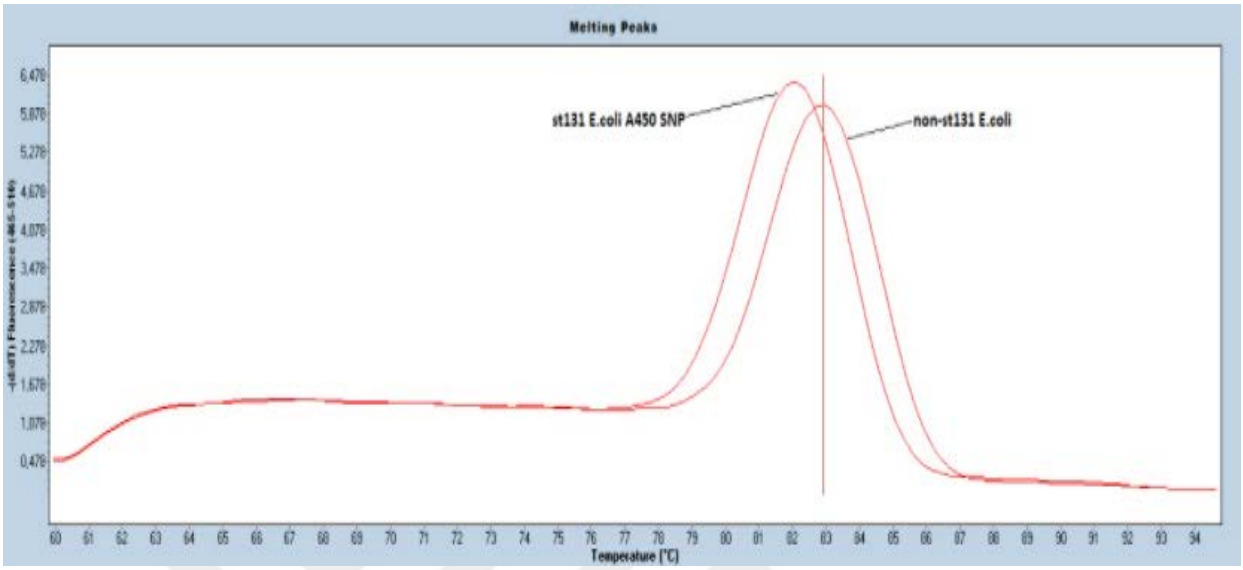
ST131AF(5´-GGC AAT CCA ATA TGA CCC-3´)ve ST131AR(5´-ACC TGG CGA AAT TTT TCG-3´)

Polimorfizmler (SNP'ler) yani pabB'de T144 ve A450 kombinasyonu ST131'e özgü olduğu için analiz iki tek nükleotidin tespitine dayanmaktadır.

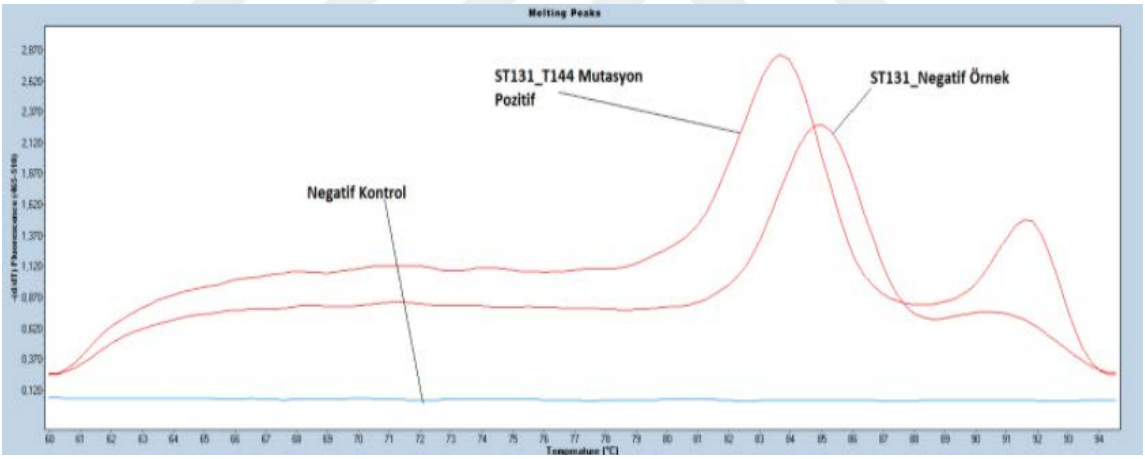
Tablo 3.2. PabB içinde ST131'e özgü hedef gen bölgelerine ait primerler

Primer	Dizi	Baz çifti (bp)	Kaynak
ST131TF	(5-GGT GCT CCA GCA GGT G-3´)	40-bp Timin SNP	H. Dhanji, 2010
ST131TR	(5´-TGG GCG AAT GTC TGC-3´)	40-bp Timin SNP	
ST131AF	(5´-GGC AAT CCA ATA TGA CCC-3´	49-bp Adenin SNP	
ST131AR	(5´-ACC TGG CGA AAT TTT TCG-3´)	49-bp Adenin SNP	

PCR işleminden sonra üretici firmanın önerileriyle Melting Curve analizi yapılarak sonuçlar yorumlandı.



Şekil 3.4. Real time PCR ST131 Adenin 450 SNP eğrime eğrisi piki



Şekil 3.5. Real time PCR ST131 Timin 144 SNP erime eğrisi piki

3.3.5.5. ST131 *E. coli* klonu

ST131 *E. coli* klonu için aşagıdaki şekilde master mix hazırlandı.

DNA master mix	Hacim
Su	11.6 µl
F primer	0.3 µl
R primer	0.3 µl
Mg	1.6 µl
Enzim	2 µl

Hazırlanan master mix spin yapıldı ardından vortekslendi. Kuyucuk başına 15 µl master miks eklendi. İlgili kuyulara örnek DNA materyalinden veya kontrollerden 4 µl eklenildi (toplam hacim 19 µl). Pipetaj yapılarak yavaşça karıştırıldı. Plate üzeri kapatıldı ve kısa süreli yaklaşık 10 saniye çalkalandı. Plate üreticinin tavsiyelerine göre termal döngüleyiciye yerleştirildi.

Kontrol olarak ST131 klon pozitif suşu kullanıldı.

ST131 klonu için 2 çift primer (1957024-1957025 Timin SNP için ile 1957026-1957027 Adenin SNP için) kendi aralarında eşleştirilerek çalışıldı. Clermont'un bulgularına göre, hem T144 hem de A450 SNP'leri içeren izolatlar ST131 olarak kabul edilmektedir.

LightCycler 480 cihazı için termal döngüleyicinin sıcaklık profili aşağıdaki gibi programlanıp çalışma başlatıldı.

Tablo 3.3. ST131 için Real-time amplifikasyon protokolü kullanıldı.

Basamak	Sıcaklık (°C)	süre	Siklus
Denatürasyon	95	10dk	1
Amplifikasyon (Quantifikasyon modu)	95	5sn	40
	55	10sn	
	72	10sn	
Melting curve (Erime eğrisi modu)	95	10sn	1
	60	1dk	
	95	00:00	
Soğutma	40	30sn	1

3.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Kategorik ölçümlerin gruplar arasında karşılaştırılmasında Ki Kare test istatistiği kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi $P< 0.05$ anlamlı olarak alındı.

SPSS referansı : IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp

4. BULGULAR

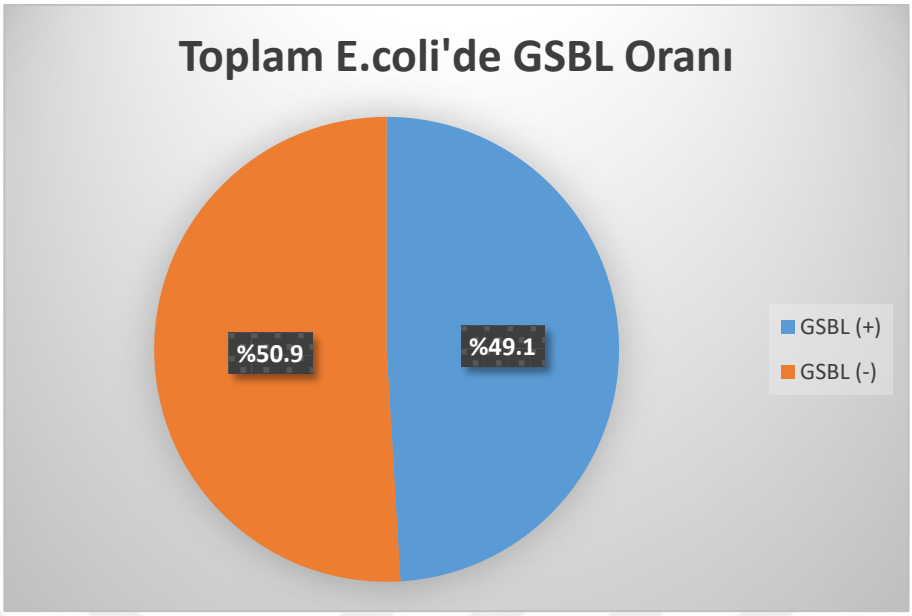
Laboratuvarımızda 17.4.2019-21.7.2019 tarihlerinde çeşitli servis ve poliklinik hastalardan alınan idrar örnekleri öncelikle etken mikroorganizmaların bulunabilmesi amacıyla MacConkey agar ve %5'lik koyun kanlı agara ekilerek 37°C'lik etüvde 48 saat inkübe edildi. İdrarda ≥ 10^5 cfu/mL üreme anlamlı kabul edilerek identifikasyonu sağlandı. Bu amaçla Gram boyama, katalaz, oksidaz ve biyokimyasal test sonuçlarına göre fenotipik olarak *E. coli* suşları saptandı.

Araştırmada *E. coli* izolatlarında GSBL üretiminin tespiti amacıyla EUCAST'ın kriterlerine uygun olarak Vitek 2 compact ve çift disk sinerji yöntemleri ile, genotipik testler ise PCR ile gerçekleştirildi.

Vitek 2 otomatize sistem ile 1262 toplam *E. coli* izolatının 860'ı idrar, 107'si kan, 68'i sürüntü, 52'si balgam, 39'u püy, 22'si vajen ve 114'ü diğer örneklerden izole edilerek tanımlanmıştır. Toplam 1262 *E. coli* izolatının 619 (%49.1)'u GSBL pozitif, 643 (%50.9)'ü GSBL negatifti. GSBL pozitif *E. coli* izolatlarının izole edildiği örneklerin 419 (%67.7)'u idrar iken bunu 53 (%8.5)'ü kan, 43 (%6.9)'ü sürüntü izolatları takip etmiştir.

Tablo 4.1. Çeşitli klinik izolatlarda *E. coli*'nin GSBL oranları

E. coli (1262)	**Sayı**		**%**	
GSBL(-)	643		50,9	
GSBL(+)	619		49.1	
TOPLAM *E.COLİ*	1262			
	***E.coli* GSBL(+)(619)**		***E.coli* GSBL(-) (643)**	
	Sayı	**%**	**Sayı**	**%**
İDRAR	419	67.7	441	68.5
KAN	53	8.5	54	8.3
SÜRÜNTÜ	43	6.9	25	3.8
BALGAM	35	5.6	17	2.6
PÜY	22	3.5	17	2.6
VAJEN	12	1.9	10	1.5
DİĞER ÖRNEKLER	35	5.6	79	12.2



Şekil 4.1. Toplam *E. coli*'de GSBL oranı

Tablo 4.2. Vitek 2 Sisteminde Antibiyotiklerin Minimum İnhibitör Konsatrasyonu (MİK) değerleri

Antibiyotikler	**MİK**
Ampisilin	S: ≤ 8, R: ≥16
AMC	İdrar S: ≤ 16, R: ≥32 Diğer S: ≤ 8, R: ≥16
TPZ	S: ≤ 8.1: 16, R: ≥32
Sefuroksim	S: ≤ 8, R: ≥16
Sefuroksim aksetil	S: ≤ 8, R: ≥16
Sefoksitin	S: ≤ 8.1:16, R: ≥32
Sefiksim	S: ≤ 1, R: ≥2
Seftazidim	S: ≤ 1.1 : 2-4, R: ≥8
Seftriakson	S: ≤ 1.1 :2 , R: ≥4
Ertapenem	S: ≤ 0.5, R: ≥1
İmipenem	S: ≤ 2.1 : 4, R: ≥8
Meropenem	S: ≤ 2.1 : 4-8, R: ≥16

AMC: Amoksisilin /klavulanik asit, TPZ: Piperasilin/ tazobaktam

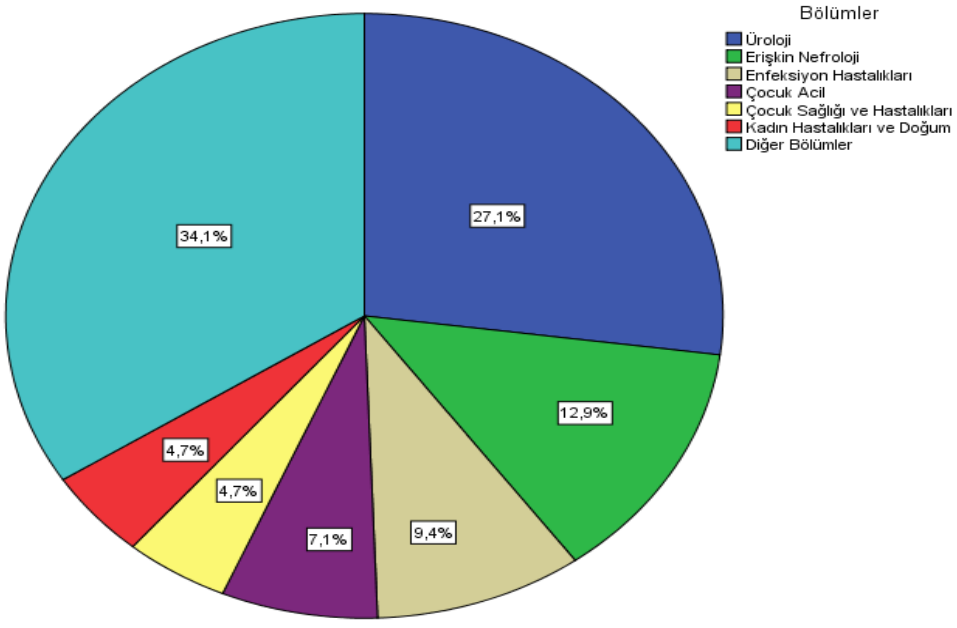
GSBL üreten bakterilerin MİK değerleri yükselmekle birlikte dirençli sınıra ulaşmayabilir. Bu da ciddi enfeksiyon tedavilerinde başarısızlığa neden olmaktadır. Vitek 2 otomatize sistem GSBL üreten mikroorganizmalar için sefazolin, seftazidim, seftriakson, sefepim ve aztreonam hassas olsa bile ise dirençli olarak rapor etmektedir.

Mikrodilüsyon testlerinde üçüncü kuşak sefalosporinlerden herhangi birinin MİK değeri ≥ 2 mg/L.olduğunda GSBL varlığı düşünülür. GSBL üreten suşlar penisilin türevleri, tüm sefalosporinler ve monobaktamlara dirençli rapor edilmelidir.

Vitek 2 ile GSBL pozitif rapor edilen *E. coli* suşlarına çift disk sinerji testi ile doğrulama testi uygulandı ve bununla da pozitif bulunan 85 suş çalışmaya dahil edildi. Suşlar Real time PCR ile de genotipik inceleme yapılıncaya kadar mikrobanka pasaj yapıldı ve suşlar -20°C'de muhafaza edildi.

DNA ekstraksiyonu için GSBL pozitif 85 *E. coli* suşu dondurucudan çıkarılarak çözdürüldü. Mikrobanktan %5'lik koyun kanlı agara (COS) pasajlanarak 18-24 saat inkübe edildi. Saf üreyen *E. coli* kültürlerden DNA izolasyonu için High Pure nükleik asit saflaştırma kiti kullanılarak DNA'lar izole edildi.

İdrardan izole edilen 85 GSBL pozitif *E. coli* suşlarının izole edildiği bölümlere göre dağılımı aşağıdaki şekildedir.



Şekil 4.2. GSBL pozitif 85 *E. coli* suşun izole edildiği bölümler

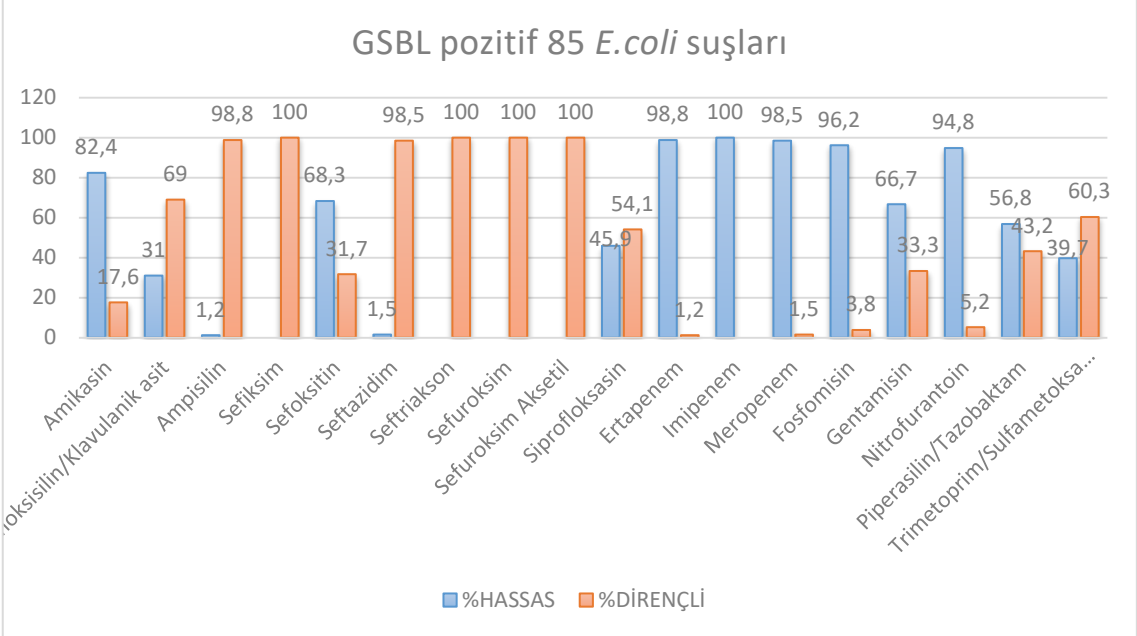
İzole edilen 85 GSBL pozitif *E. coli* suşun 28(%32.9)'i erkek, 57(%67.1)'si kadın hastaya aitti. Bu hastaların 24(%28.2)'ü poliklinik, 61(%71.8)'i servis hastasıydı.

İdrar örneklerinden izole edilen toplam 85 GSBL pozitif *E coli* izolatının 25(%29.4)'i CTX-M-15'i pozitifken, 34(%40)'ü CTX-M-3 pozitif olup, toplam 59(%69.4)'u bla CTX-M genleri için pozitifti; CTX-M-3'ün CTX-M-15'e göre daha yüksek oranda saptandığı görülmektedir. Bu izolatların 26(%30.6)'sında CTX-M-3 ve CTX-M-15 β-laktamazlarından herhangi birine rastlanılmamıştır. *E. coli* ST131 klonunu tespit etmek amacıyla 85 GSBL pozitif *E. coli* suşunun 23(%27.1)'ünde ST131 klonunu tespit ettik ve 62(%72.9)'sinde ise ST131 klonuna rastlanılmadı.

GSBL pozitif 85 *E. coli* suşlarının antibiyotik direnci tablo 4.3'te gösterilmiştir.

*Her paneldeki antibiyotik skalası farklı olduğu için total bakılan antibiyotik sayıları da farklı olduğundan buradaki veriler % olarak verilmiştir.

Tablo 4.3. GSBL pozitif 85 *E.coli* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Oranları



Orta hassas izolatlar da istatistiksel analiz sırasında dirençli kabul edildi.

Çalışmamızdaki 85 GSBL pozitif *E. coli* suşlarının antibiyotik direnç oranları şöyleydi; sefiksim 71(%100), seftriakson 64(%100), sefuroksim 64(%100), sefuroksim aksetile 77(%100) iken, amoksisilin/klavulanik asite (AMC) 58(%69), trimetoprim /sulfametoksazol (TMP/SMX) 44(%60.3), siprofloksasine 46(%54.1) idi. β-laktam/β-laktamaz inhibitörü olarak AMC'nin direnci piperasilin/tazobaktama (TPZ) göre daha

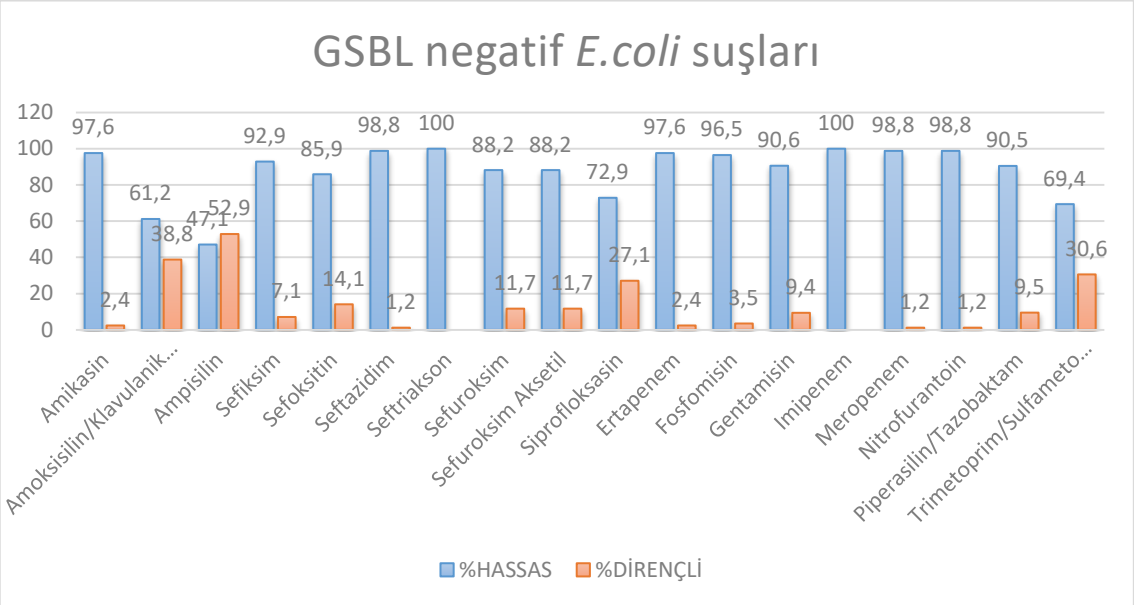
yüksek olduğu görülmektedir. Duyarlılığı ise; İmipenem 58(%100), meropenem 64(%98.5), ertapenem 82(%98.8), fosfomisin 75(%96.2) nitrofrantoin 73(%94.8), amikasin 70(%82.4), sefoksitin 43(%68.3) gentamisin 56(%66.7) ve TPZ'ye 42(%56.8) olarak belirlendi.

Tablo 4.3'te görüldüğü gibi GSBL pozitiflerde sefiksim, seftriakson, sefuroksim, sefuroksim aksetil, seftazidim, ampisilin dirençlerinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. En düşük direnç ertapenem, meropenem, fosfomisin ve nitrofurantoine karşı görülmüştür.

Kontrol amacıyla aldığımız 85 GSBL negatif idrar izolatlarında antibiyotik direnç oranları aşağıda gösterilmiştir.(Tablo 4.4)

*Her paneldeki antibiyotik skalası farklı olduğu için total bakılan antibiyotik sayıları da farklı olduğundan buradaki veriler % olarak verilmiştir.

Tablo 4.4. GSBL negatif 85 *E. coli* suşunun antibiyotik direnç oranları



Orta hassas izolatlar da istatistiksel analiz sırasında dirençli kabul edildi.

GSBL negatif 85 *E. coli* suşunun antibiyotik duyarlılığı ise şöyleydi; imipenem ve seftriakson 85(%100), meropenem 84(%98.8), seftazidim ve nitrofrantoin 84(%98.8), ertapenem ve amikasin 83(%97.6), fosfomisin 82(%96.5), gentamisin 77(%90.6), TPZ 76(%90.5), sefuroksim ve sefuroksim aksetil 75(%88.2), sefoksitin 73(%85.9), TMP/SMX 59(%69.4), ve AMC'ye 52(61.2) şeklinde idi

Tablo 4.4 incelendiğinde, en yüksek direnç ampisiline %52.9 karşı görülmüş olup bunu AMC %38.8 ve TMP/SMX %30.6 takip etmiştir.

Çalışmamızda 85 idrar izolatlarında GSBL pozitif ve negatif *E. coli* suşlarının direnç oranlarını karşılaştırdığımızda; GSBL negatif suşların sadece ampisiline direnci yüksek iken, GSBL pozitif suşların karbapenemler hariç diğer antibiyotiklere yüksek direnç gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 4.5. GSBL pozitif ve negatif 85 *E. coli* suşunun antibiyotik duyarlılıklarında P değerleri

Antibiyotikler	**85 GSBL (+) *E.coli***		**85 GSBL (-) *E. coli***		**P değeri**
	Hassas	**Dirençli**	**Hassas**	**Dirençli**	
Amikasin	70(%82.4)	15(%17.6)	83(%97.6)	2(%2.4)	0.001
AMC	26(%31.0)	58(%69.0)	52(%61.2)	33(%38.8)	<0.001
Ampisilin	1(%1.2)	84(%98.8)	40(%47.1)	45(%52.9)	<0.001
Sefiksim		71(%100)	79(%92.9)	6(%7.1)	<0.001
Sefoksitin	43(%68.3)	20(%31.7)	73(%85.9)	12(%14.1)	0.010
Seftazidim	1(%1.5)	64(%98.5)	84(%98.8)	1(%1.2)	<0.001
Seftriakson		64(%100)	85(%100)		<0.001
Sefuroksim		64(%100)	75(%88.2)	10(%11.7)	<0.001
Sefuroksim aksetil		77(%100)	75(%88.2)	10(%11.7)	<0.001
Siprofloksasin	39(%45.9)	46(%54.1)	62(%72.9)	23(%27.1)	<0.001
Ertapenem	82(%98.8)	1(%1.2)	83(%97.6)	2(%2.4)	1.000
Fosfomisin	75(%96.2)	3(%3.8)	82(%96.5)	3(%3.5)	1.000
Gentamisin	56(%66.7)	28(%33.3)	77(%90.6)	8(%9.4)	<0.001
İmipenem	58(%100)		85(%100)		
Meropenem	64(%98.5)	1(%1.5)	84(%98.8)	1(%1.2)	1.000
Nitrofurantoin	73(%94.8)	4(%5.2)	84(%98.8)	1(%1.2)	0.192
TPZ	42(%56.8)	32(%43.2)	76(%90.5)	8(%9.5)	<0.001
TMP/SMX	29(%39.7)	44(%60.3)	59(%69.4)	26(%30.6)	<0.001

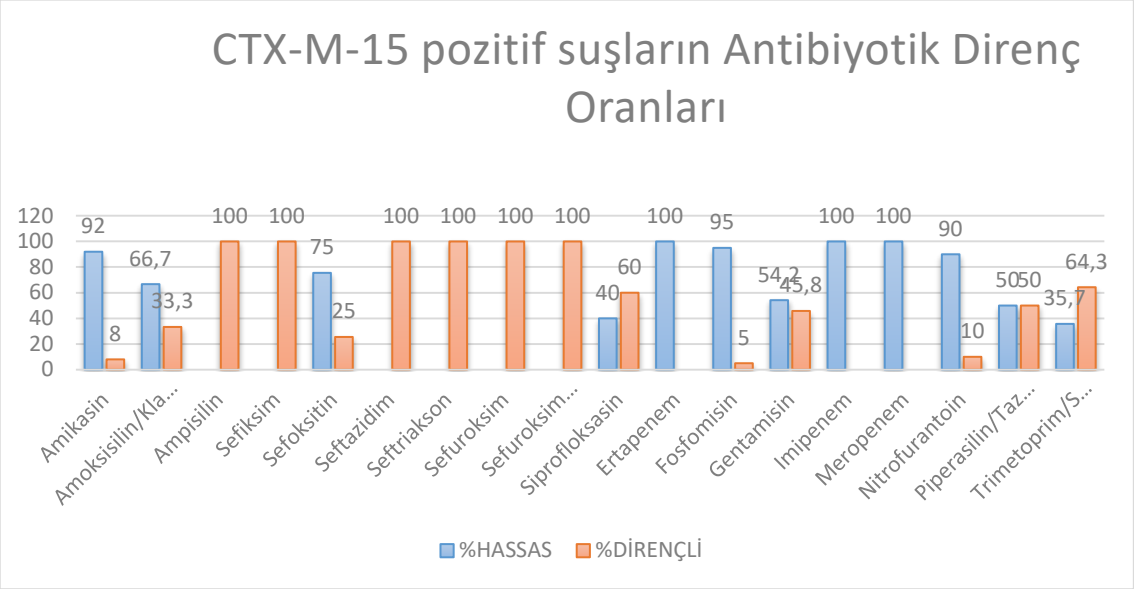
Tablo 4.5'te GSBL pozitif ve GSBL negatif *E. coli* suşları arasındaki antibiyotik direnç profilleri verilmiştir. AMC, ampisilin, sefiksim, seftazidim, seftriakson,

sefuroksim, sefuroksim aksetil, siprofloksasin, gentamisin, TPZ ve TMP/SMX direnci karşılaştırıldığında GSBL pozitif suşların, GSBL negatif suşlara göre anlamlı oranda daha dirençli oldukları saptanmıştır (P<0.001). Gruplar arasında ertapenem, meropenem fosfomisin, nitrofurantoin de istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi (P>0.005)

İdrarda 85 *E. coli* CTX-M-15 β-laktamaz pozitif suşların antibiyotik direnç oranları aşağıda gösterilmiştir.(Tablo4.6)

*Her paneldeki antibiyotik skalası farklı olduğu için total bakılan antibiyotik sayıları da farklı olduğundan buradaki veriler % olarak verilmiştir.

Tablo 4.6. *E. coli* CTX-M-15 pozitif suşların antibiyotik direnç oranları



Orta hassas izolatlar da istatistiksel analiz sırasında dirençli kabul edildi.

Çalışmamızda CTX-M- 15 izolatların antimikrobiyal direnç oranlarına baktığımızda sonuçları incelenmiş, bu izolatlarda ampisilin 25(%100), sefiksim 14(%100) iken, seftazidim 14(%100), seftriakson 13(%100), sefuroksim 13(%100), sefuroksim aksetile direnç 18(%100) bunu TMP/SMX 9(%64.3) ve siprofloksasin 15(%60) ve TPZ 12(%50) direnç oranı ile takip etmiştir.

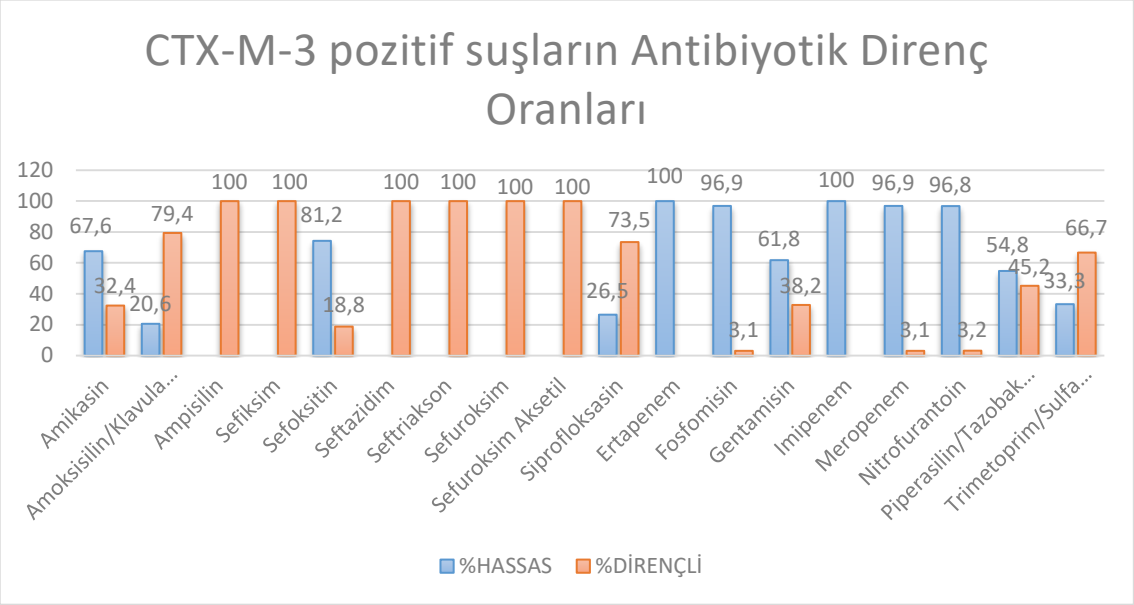
CTX-M-15 pozitif izolatların da duyarlılık oranları ise şöyledir; karbapenemlere %100 duyarlı [imipenem 9(%100), meropenem 14(%100), ertapenem 23(%100)] fosfomisine 19(%95), amikasine 23(%92) ve nitrofrantoine ise 18(%90), sefoksitin, AMC, gentamisine ve TPZ'ye ise sırasıyla 9(%75), 8(%66.7), 13(%54.2), 12(%50) şeklindeydi.

CTX-M-15'te ampisilin, sefiksim, seftazidim, seftriakson, sefuroksim ve sefuroksim aksetil en yüksek direnç (%100) oranına karşılık, karbapenemlere direnç görülmezken bundan sonra en düşük direnç fosfomisin (%5), amikasin (%8) ve nitrofurantoine (%10) karşı görülmüştür.

Tablo 4.7'de 85 izolatın 34'ü (%40) CTX-M-3 β-laktamaz içermekte olup, antibiyotik direnç oranları gösterilmiştir.

*Her paneldeki antibiyotik skalası farklı olduğu için total bakılan antibiyotik sayıları da farklı olduğundan buradaki veriler % olarak verilmiştir.

Tablo 4.7. *E. coli* CTX-M-3 pozitif suşların antibiyotik direnç oranları



Orta hassas izolatlar da istatistiksel analiz sırasında dirençli kabul edildi.

E. coli CTX-M-3 pozitif izolatlarda antibiyotik direnç; ampisilin 34(%100), sefiksim 32(%100), seftazidim 32(%100), seftriakson 32(%100), sefuroksim 32(%100), sefuroksim aksetil 34(%100) olarak tespit edildi. Bunu 27(%79.4) ile AMC, 25(%73.5) siprofloksasin ve 22(%66.7) ile TMP/SMX takip etti. Duyarlılıkları ise; ertapenem 34(%100) ve imipeneme 30(%100), meropenem 31(%96.9), nitrofrantoin 30(%96.8) ve fosfomisine 31(%96.9)olarak saptanırken, sefoksitin, amikasin, gentamisin ve TPZ duyarlılıkları ise sırasıyla 26(%81,2), 23(%67.6), 21(%61.8) ve 17(%54.8) olarak tespit edildi.

Tablo 4.7'deki CTX-M-3'de ampisilin, sefiksim, seftazidim, seftriakson, sefuroksim, sefuroksim aksetil'e karşı yüksek oranlarda (%100) direnç tespit edilirken meropenem(%3.1), fosfomisin (%3.1), nitrofurantoin (%3.2) dirençlerinin düşük düzeyde olduğu görülmektedir.

CTX-M-3 ve CTX-M-15 β-laktamaza sahip *E.coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını birbiriyle kıyasladığımızda şu sonuçlar elde edilmiştir; CTX-M-15 pozitif suşlar CTX-M-3'e göre AMC'ye daha hassas, aminoglikozidlerden amikasine daha hassas iken gentamisine daha dirençli idi.

Tablo 4.8. CTX-M-3 ve CTX-M-15 pozitif izolatların antibiyotik duyarlılıklarının P değerleri

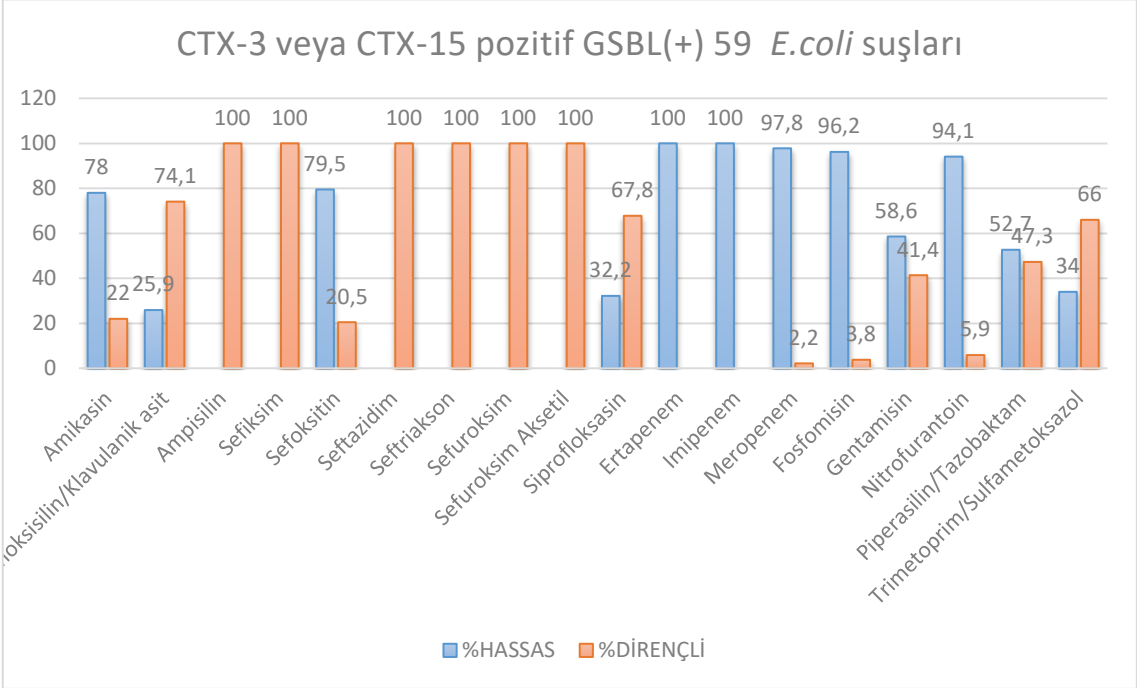
Antibiyotikler	**CTX-M-3**		**CTX-M-15**		**P değeri**
	Hassas	**Dirençli**	**Hassas**	**Dirençli**	
Amikasin	23(%67.6)	11(%32.4)	23(%92)	2(%8)	0.026
AMC	7(%20.6)	27(%79.4)	8(%66.7)	16(%33.3)	0.275
Ampisilin		34(%100)		25(%100)	
Sefiksim		32(%100)		14(%100)	
Sefoksitin	26(%81.2)	6(%18.8)	9(%75)	3(%25)	0.687
Seftazidim		32(%100)		14(%100)	
Seftriakson		32(%100)		13(%100)	
Sefuroksim		32(%100)		13(%100)	
Sefuroksim aksetil		34(%100)		18(%100)	
Siprofloksasin	9(%26.5)	25(%73.5)	10(%40)	15(%60)	0.272
Ertapenem	34(%100)		23(%100)		
Fosfomisin	31(%96.9)	1(%3.1)	19(%95)	1(%5)	1.000
Gentamisin	21(%61.8)	13(%38.2)	13(%54.2)	11(%45.8)	0.563
İmipenem	30(%100)		9(%100)		
Meropenem	31(%96.9)	1(%3.1)	14(%100)	-	1.000
Nitrofurantoin	30(%96.8)	1(%3.2)	18(%90)	2(%10)	0.553
TPZ	17(%54.8)	14(%45.2)	12(%50)	12(%50)	0.721
TMP/SMX	11(%33.3)	22(%66.7)	5(%35.7)	9(%64.3)	1.000

Tablo 4.8'de amikasin CTX-M-15'te (%92) yüksek hassasiyete sahip buna karşılık CTX-M-3'te (%32.4) CTX-M-15'e (%8) göre amikasin direnç oranının yaklaşık 4 kat daha fazla olduğu görülmektedir (P=0.026).

Diğer antibiyotikler arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

*Her paneldeki antibiyotik skalası farklı olduğu için total bakılan antibiyotik sayıları da farklı olduğundan buradaki veriler % olarak verilmiştir.

Tablo 4.9. CTX-M-3 veya CTX-M-15 pozitif *E. coli* suşlarının direnç oranları

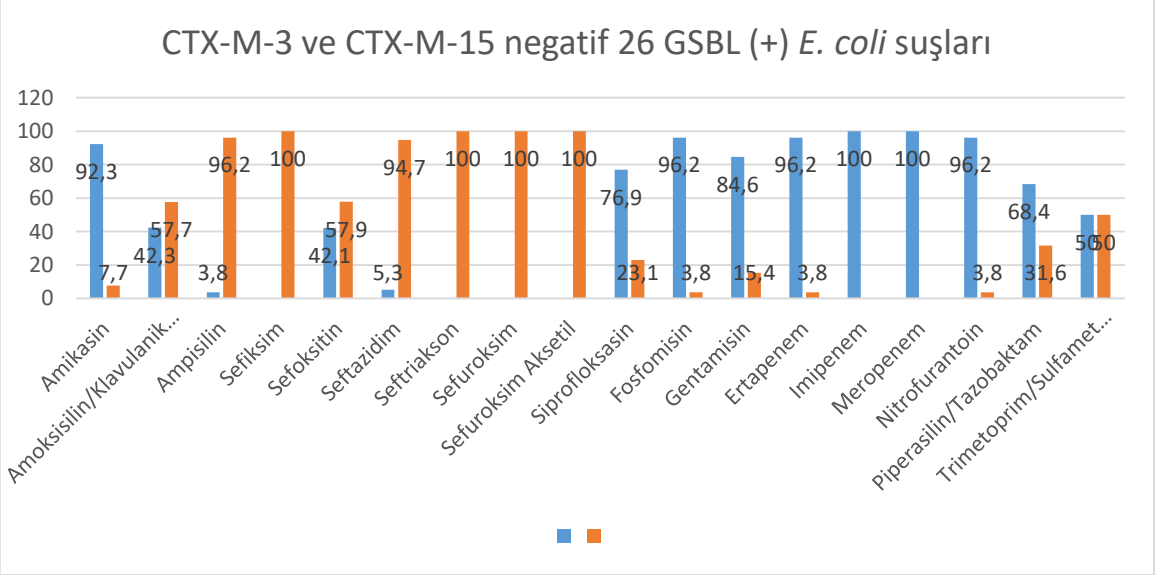


CTX-M-3 veya CTX-M-15 β-laktamaz pozitif *E. coli* suşların 59(%69.4) dirençleri; Sefiksim, seftazidim, seftriakson, sefuroksim ve sefuroksim aksetile %100, siprofloksasine 40(%67.8), AMC'ye 43(%74.1) oranında direnç geliştirdikleri saptandı. AMC'nin TPZ'ye göre daha fazla direnç geliştirdiği belirlenmiştir.

Çalışmamızda 85 GSBL pozitif *E. coli* suşlarında CTX-M-3 veya CTX-M-15 β-laktamazlarından rastlanılmayan 26(%30.5) suşun antibiyotik direnç oranları Tablo 4.10'da gösterilmiştir.

*Her paneldeki antibiyotik skalası farklı olduğu için total bakılan antibiyotik sayıları da farklı olduğundan buradaki veriler % olarak verilmiştir.

Tablo 4.10. CTX-3 ve CTX-M-15 negatif GSBL Pozitif 26 *E. coli* Suşları



Orta hassas izolatlar da istatistiksel analiz sırasında dirençli kabul edildi.

CTX-M-3 veya CTX-M-15 negatif GSBL pozitif 26(%30.5) suşun direnci incelendiğinde; sefiksim ve sefuroksim aksetil 25(%100), seftriakson ve sefuroksim 19(%100), ampisilin 25(96.2), seftazidim 18(%94.7) sefoksitin 11(%57.9), AMC 15(%57.7) idi. Duyarlılığı ise, imipenem ve meropenem 19(%100), ertapenem, nitrofrantoin ve fosfomisin 25(%96.2), amikasine 24(%92.3), gentamisin 22(%84.6) TPZ'ye 13(%68.4) idi.

CTX-M β-laktamazlarına sahip olmayan 26 suşta da siprofloksasin direnci 20(%76.9) idi.

Tablo 4.11. CTX-M-3 ve CTX-M-15 pozitif 59 suş ile CTX-M-3 ve CTX-M-15 negatif 26 suşun antibiyotik duyarlılıkları

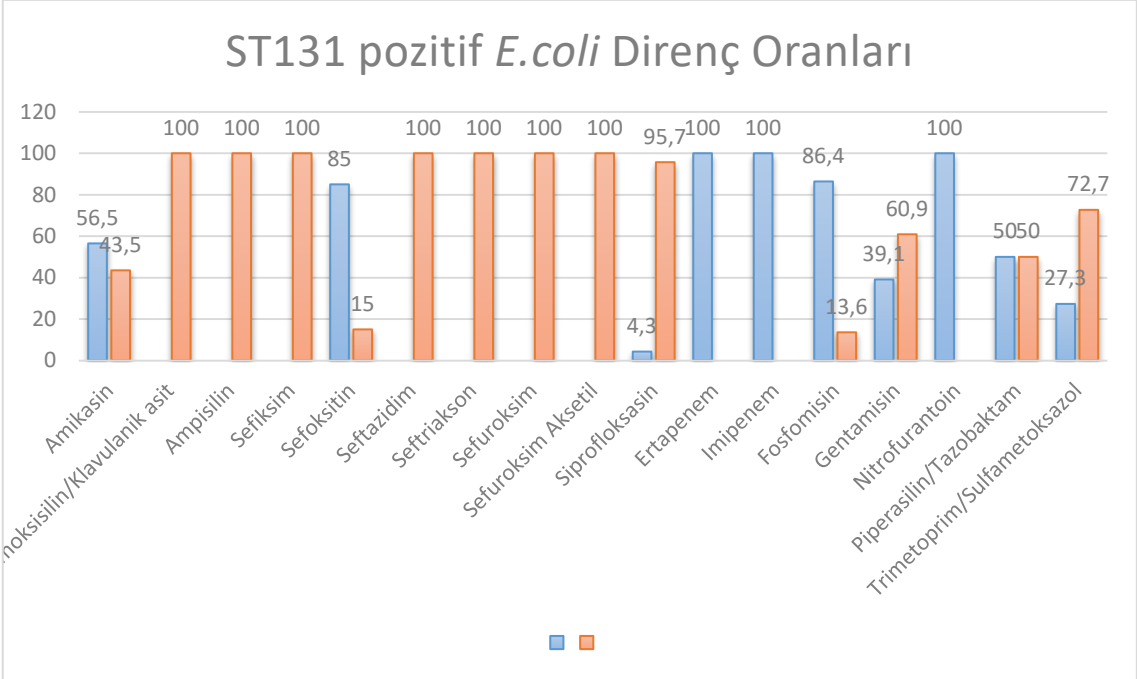
Antibiyotikler	**CTX-M-3 ve CTX-M-15 pozitif 59 suş**		**CTX-M-3 ve CTX-M-15 negatif 26 suş**		**P değeri**
	Hassas	**Dirençli**	**Hassas**	**Dirençli**	
Amikasin	46(%78.0)	13(%22.0)	24(%92.3)	2(%7.7)	0.134
AMC	15(%25.9)	43(%74.1)	11(%42.3)	15(%57.7)	0.132
Ampisilin		59(%100)	1(%3.8)	25(%96.2)	0.306
Sefiksim		46(%100)		25(%100)	
Sefoksitin	35(%79.5)	9(%20.5)	8(%42.1)	11(%57.9)	0.003
Seftazidim		46(%100)	1(%5.3)	18(%94.7)	0.292
Seftriakson		45(%100)		19(%100)	
Sefuroksim		45(%100)		19(%100)	
Sefuroksim aksetil		52(%100)		25(%100)	
Siprofloksasin	19(%32.2)	40(%67.8)	20(%76.9)	6(%23.1)	<0.001
Ertapenem	57(%100)		25(%96.2)	1(%3.8)	0.313
Fosfomisin	50(%96.2)	2(%3.8)	25(%96.2)	1(%3.8)	1.000
Gentamisin	34(%58.6)	24(%41.4)	22(%84.6)	4(%15.4)	0.019
İmipenem	39(%100)		19(%100)		
Meropenem	45(%97.8)	1(%2.2)	19(%100)		1.000
Nitrofurantoin	48(%94.1)	3(%5.9)	25(%96.2)	1(%3.8)	1.000
TPZ	29(%52.7)	26(%47.3)	13(%68.4)	6(%31.6)	0.234
TMP/SMX	16(%34.0)	31(%66.0)	13(%50.0)	13(%50.0)	0.182

CTX-M-3 veya CTX-M-15 pozitif suşlarla CTX-M-3 ve CTX-M-15 negatif suşların sefoksitin, siprofloksasin ve gentamisine ait duyarlılık testlerinin kıyaslanmasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($P<0.05$). Diğer antibiyotikler arasında ise anlamlı fark tespit edilmedi.($P>0.05$)

ST131 KLONU: ST131 klonunun varlığı iki tek nükleotidin tespitine dayanmaktadır. Polimorfizimler (SNP'ler) yani pabB'de Timin (T144) ve Adenin (A450) kombinasyonu ST131'e özgü olup, pabB SNP'lerin ortaya çıkması izolatın ST131'e ait olduğunu göstermektedir.(Tablo 4.12) Seksen beş izolatın 23 (%27.1)'ünde ST131 klonu pozitif iken, 62 (% 72.9)'sinde negatif idi.

*Her paneldeki antibiyotik skalası farklı olduğu için total bakılan antibiyotik sayıları da farklı olduğundan buradaki veriler % olarak verilmiştir.

Tablo 4.12. ST131 pozitif *E. coli* Antibiyotik direnç oranları



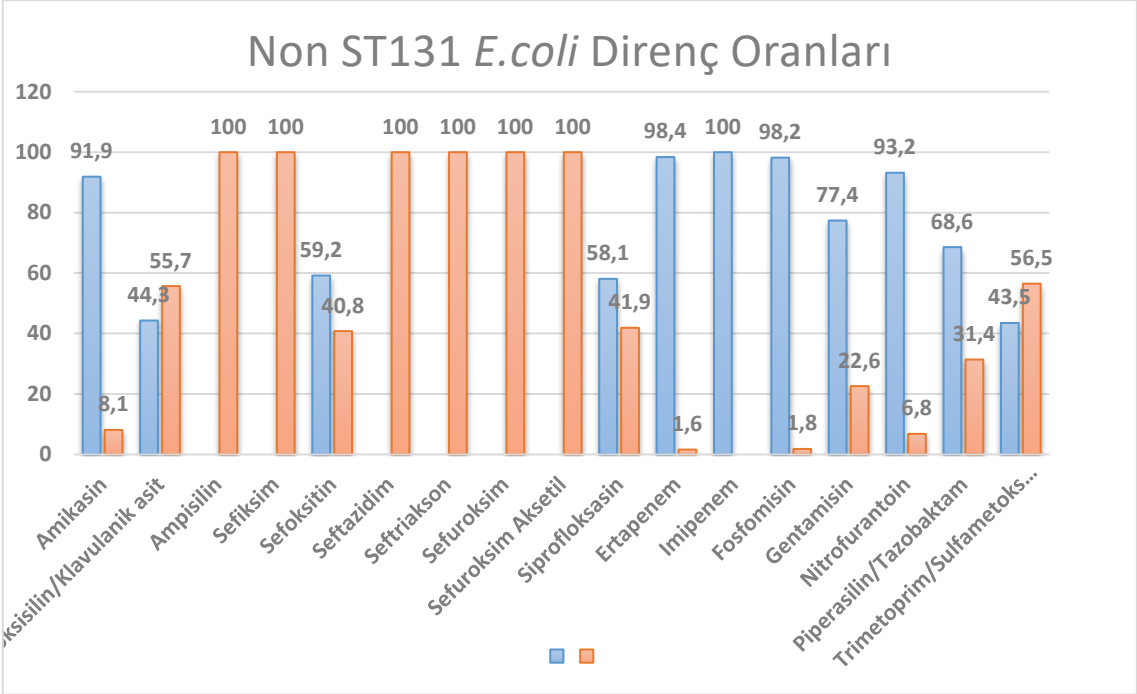
Orta hassas izolatlar da istatistiksel analiz sırasında dirençli kabul edildi.

ST131 *E. coli* Klonuna Sahip İzolatların Antibiyotik Direnç Oranları : ST131 klonu pozitif *E. coli*'ye ait izolatlarda en yüksek antibiyotik direnci AMC 23(%100), ampisilin 23(%100), sefiksim 23(%100), seftazidim 20(%100), seftriakson 20(%100), sefuroksim 20(%100) ve sefuroksim aksetil 21(%100)'de görülmüş olup, bunu siprofloksasin 22(%95.7), TMP/SMX 16(%72.7) ve gentamisin 14(%60.9) takip etmiştir.

E. coli ST131 klonu pozitif *E. coli* suşlarında duyarlılık ise, imipenem 19(%100) ve ertapenem 23(%100), nitrofrantoine 22(%100), fosfomisin 19(%86.4), sefoksitin 17(%85), amikasin 13(%56.5) ve TPZ'ye 10(%50) olarak tespit edilmiştir.

Non ST131 *E. coli* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Oranları

Tablo 4.13. ST131 negatif *Ecoli* suşlarının Antibiyotik Direnç Oranları



Orta hassas izolatlar da istatistiksel analiz sırasında dirençli kabul edildi.

*Her paneldeki antibiyotik skalası farklı olduğu için total bakılan antibiyotik sayıları da farklı olduğundan buradaki veriler % olarak verilmiştir.

Tablo 4.13'de *E. coli* non ST131 izolatlarının antibiyotik direnci, ampisilin 60(%100), sefiksim 56(%100), seftazidim 51(%100), seftriakson 50(%100), sefuroksim 50(%100), sefuroksim aksetil 57(%100), AMC'ye 34(%55.7), TMP/SMX'e 35(%56.5) idi.

E. coli non ST131 izolatlarının antibiyotik duyarlığı şöyleydi; imipenem 48(%100), ertapenem 61(%100), fosfomisin 56(%98.2), nitrofrantoin 55(%93.2), amikasin 57(%91.9), gentamisin 48(%77.4), TPZ 35(%68.6), sefoksitin 29(%59.2) ve siprofloksasin 36(%58.1) olarak bulunmuştur.

Tablo 4.14. ST131 pozitif ve negatif *E. coli*'lerin izole edildiği hastalarda kullanılan antibiyotikler

Antibiyotikler	ST131		NON ST131		P değeri
	Hassas	Dirençli	Hassas	Dirençli	
Amikasin	13(%56.5)	10(%43.5)	57(%91.9)	5(%8.1)	<0.001
AMC		23(%100)	27(%44.3)	34(%55.7)	<0.001
Ampisilin		23(%100)		60(%100)	
Sefiksim		23(%100)		56(%100)	
Sefoksitin	17(%85)	3(%15)	29(%59.2)	20(%40.8)	0.039
Seftazidim		20(%100)		51(%100)	
Seftriakson		20(%100)		50(%100)	
Sefuroksim		20(%100)		50(%100)	
Sefuroksim aksetil		21(%100)		57(%100)	
Siprofloksasin	1(%4.3)	22(%95.7)	36(%58.1)	26(%41.9)	<0.001
Ertapenem	23(%100)		61(%100)		
Fosfomisin	19(%86.4)	3(%13.6)	56(%98.2)	1(%1.8)	0.063
Gentamisin	9(%39.1)	14(%60.9)	48(%77.4)	14(%22.6)	0.001
İmipenem	19(%100)		48(%100)		
Nitrofurantoin	22(%100)		55(%93.2)	4(%6.8)	0.570
TPZ	10(%50)	10(%50)	35(%68.6)	16(%31.4)	0.045
TMP/SMX	6(%27.3)	16(%72.7)	27(%43.5)	35(%56.5)	0.179

Tablo 4.14'te görüldüğü üzere ST131 pozitif ve negatif suşların antibiyotik duyarlılıklarına baktığımızda amikasin, AMC, sefiksim, sefoksitin, siprofloksasin, gentamisin ve TPZ'de anlamlı fark görülürken, diğerlerinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (P>0.05).

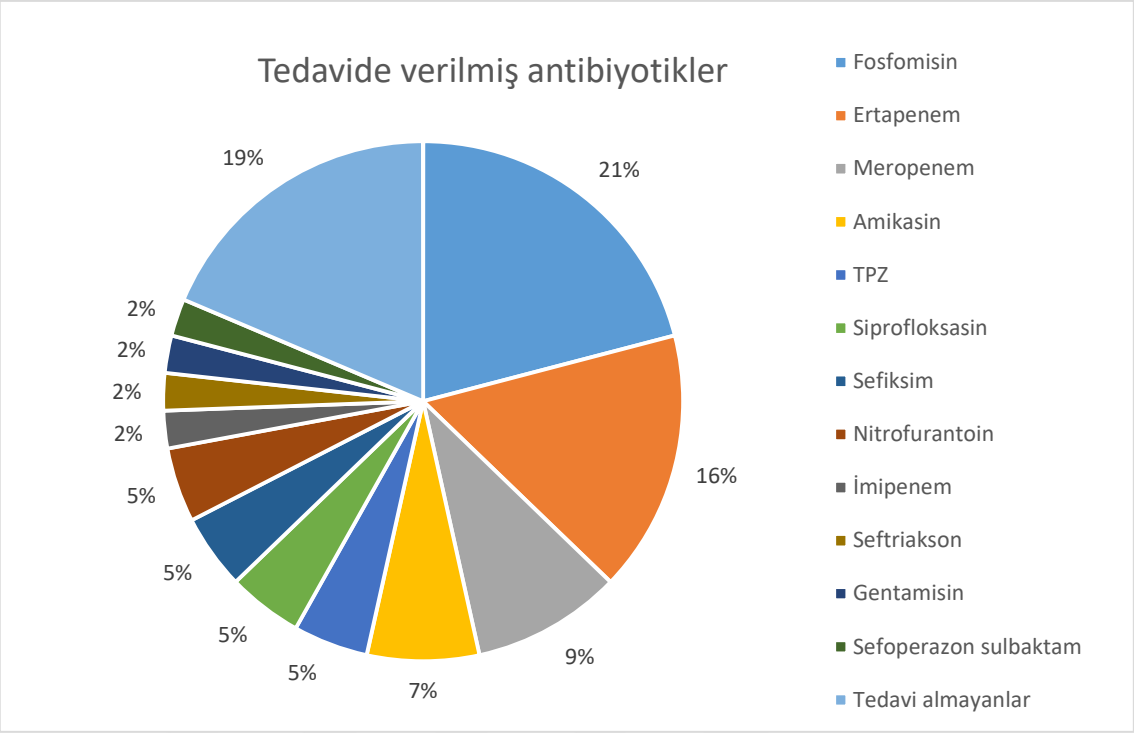
CTX-M-3 ve CTX-M-15 GSBL'lere sahip *E. coli* suşlarının izole edildiği hastalarda risk faktörlerinden en çok sistemik enfeksiyon bulgusunun olması 50(%58.9) ile 3 ay içinde antibiyotik kullanımı 66(%77.6) diğer risk faktörlerinden yüksekti (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. CTX-M-3 ve CTX-M-15 β-laktamazlara sahip hastaların klinik değerlendirilmesinde risk faktörleri

RİSK FAKTÖRLERİ	VAR	YOK	BİLİNMEYEN
Sistemik enfeksiyon bulgusu	50(%58.9)	35(%41.1)	
Sepsis	14(%16.5)	71(%83.5)	
İmmün süpresyon	10(%11.8)	75(%88.2)	
İmmünsüpresif steroid alımı	2(%2.4)	83(%97.6)	
İmmünsüpresif kemoterapi alan	12(%14.1)	73(%85.9)	
3 ay içinde antibiyotik kullanan	**66(%77.6)**	**18(%21.2)**	**1(%1.2)**

CTX-M-3 ve CTX-M-15 β-laktamazlara sahip hastaların altta yatan hastalıkları en fazla Ürolojik Bozukluk 40(%47.0) iken Solid Malign Hastalığı 10(%11.7), Nörolojik Hastalık 6(%7.0), Major Cerrahi, Hematolojik Malign Hastalığı, Kronik Böbrek Hastalığı, Gebelik 4(%4.7), Diabet, Epilepsi/Mental Retardasyon, Chron Hastalığı, Böbrek Nakli, Böbrek Yetmezliği, Akciğer Hastalığı olan ve altta yatan hastalığı olmayan 2(%2.3) kişi idi.

Tedavide verilmiş antibiyotikler ise; en fazla Fosfomisin 18(%21.1), bunu sırasıyla Ertapenem 14(%16.4), Meropenem 8(%9.4), Amikasin 6(%7.0), Piperasilin/ Tazobaktam, Siprofloksasin, Sefiksim, Nitrofrantoin 4(%4.7). İmipenem, Seftriakson, Gentamisin ve Sefoperazon sulbaktam 2(%2.3), antibiyotik tedavisi almayanlar ise 16 (%18.8) idi. (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. CTX-M-3 ve CTX-M-15 β-laktamaz pozitif *E.coli* suşlarını izole ettiğimiz hastaların kullandıkları antibiyotikler

Bu hastaların tamamı 28 gün içinde iyileşmişlerdir. Görüldüğü gibi hastaların çoğunda önemli bir altta yatan hastalık ve antibiyotik kullanımı mevcuttu. Bu da izole edilen etken patojende direnç potansiyeline neden olabileceğini düşündürmektedir.

5. TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2015 raporunda, *E. coli'*nin yaklaşık yılda 550 milyon hastalığa ve bunların 230.000'inin ölümle sonuçlandığını açıklamıştır.[128]

Son yıllarda toplum ve hastane kaynaklı GSBL pozitif *E.coli* prevalansında dramatik bir artış olmaktadır.

2000'li yılların başında GSBL varyantlarının SHV ve TEM gruplarından CTX-M enzimlerine kaymasından sonra, şu anda CTX-M-15 Avrupa'da ve dünyada en yaygın GSBL'dir. CTX-M-3'ten 240. pozisyonda (Asp240 → Gly) tek bir amino asit ikamesi ile CTX-M-15. ortaya çıkmıştır.

Polonya'da 2000 yılında 10 farklı şehirde 15 hastanede birkaç suşun klonal yayılması ve özellikle *E. coli, K.pneumoniae, K. oxytoca, C. freundii, S. marcescens, E. cloacae ve M. morganii*'de. CTX-M-3 kodlayan bir plazmidin yayılması nedeniyle büyük hastane içi salgın CTX-M-3 enziminin ülkede yayıldığını göstermiştir. Ayrıca *S. enterica serovar typhimurium* suşlarının da ayrı bir CTX-M-3-kodlayıcı plazmid barındırdığı yakın zamanda bildirilmiştir. Daha önce Hindistan'da tanımlanan bir CTX-M-3 varyantı olan CTX-M-15 Polonya'nın yanı sıra Bulgaristan, Romanya ve Türkiye'de gözlemlenmiştir.

CTX-M enzimleri günümüzde dünya çapında en yaygın GSBL'dir. Ülkemizde bu konuda çok az sayıda çalışma mevcut olup, en sık saptanan CTX-M enzimlerinden CTX-M-15, CTX-M-3 ve CTX-M-1'dir. CTX-M-3 enzimi genellikle Doğu Avrupa ülkelerinde yaygındır. Ögedey ve arkadaşlarının 2009'da ülkemizde yaptığı çalışmasında çeşitli örneklerden toplanan 593 izolatta %34.3'ünün GSBL pozitif *E. coli* bunun %96'sının CTX-M enzimleri (CTX-M-1,2,8 ve 9 grupları) taşıdığı ve GSBL pozitif 186 izolatın 165(%88.7)'inde CTX-M-15, 11'inde CTX-M-3 saptamışlardır.[143]

Gürpınar'ın 2015 çalışmasında GSBL pozitif saptanan kan izolatlarında *bla*CTX-M 78(%49,7) oranında ve 71(%45,2) oranında da *bla*CTX-M-15 tespit etmişler.[154]

Bektaş ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada GSBL pozitif 100 *E. coli* izolatında β-laktamaz genlerin varlığını araştırmışlardır. Sonuçta CTX-M %92 oranla en sık saptanan direnç geni olarak bulunmuştur.[129]

Güran'ın çalışmasında 2012-2013 yılları arasında klinik örneklerden izole edilen karbapenem dirençli Gram negatif basillerde karbapenem direncinin Multiplex PCR ile moleküler analizinde 25 *E. coli* izolatının 4(%16)'ünün CTX-M olduğunu tespit etmişlerdir.[184]

Yumuk ve ark. 2008'de İzmir'de teşhis edilen 3108 İYE'nin 82(%2,6)'si toplum kökenli *E. coli* izolatlarından kaynaklandığı, 17(%21)'sinin GSBLpozitif olup, %53'ünün CTX-M-15'e sahip olduğunu tespit etmişlerdir.[130]

Çelik ve arkadaşları 2006'da toplum kökenli İYE'den toplanan 30 izolatın 11(%36.7)'inde GSBL pozitif *E.coli*'yi saptamışlar, bunun 1 tanesi CTX-M-1, 3 tanesi CTX-M-3 ve 7 tanesini de CTX-M-15 olarak saptamışlardır.[131]

SENTRY surveyans programına göre Çin'in farklı bölgelerinde CTX-M-3'ün GSBL üreten *E.coli'*de %13-35 hızlı artış olduğu bildirilmiştir.[45]

Lob ve arkadaşları 2015 yılında Avrupa'da GSBL pozitif *E coli*'nin yaklaşık %15 oranında arttığını, Kuzey Amerika'da %10 ve ABD'de %18,3 GSBL oranı ile 2010'da %7,8 , 2014'te %18,3'e yükseldiğini bildirmişlerdir. Jean ve arkadaşları 2016 yılında, Orta Asya ve Güneydoğu Asya'da nozokomiyal GSBL *E coli* izolatlarının %20-40, Çin'de ise %60-70 oranda yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Flokas ve arkadaşları 2017'de bir meta analizde, uzun süreli bakım tesislerinde GSBL oranlarını Avrupa ülkelerinde %10-60, Çin'de yaklaşık %50 olarak hastanede toplanan verilere benzer eğilim gösterdiğini bildirmişlerdir. Bevan ve arkadaşları 2017'de Güneydoğu Asya, Hindistan dahil Güney Asya'da blaCTX-M-15 genlerinin baskın gen olduğunu bildirmişlerdir.[132]

Malini ve arkadaşları İYE ve GSBL pozitif *E. coli'*nin prevalansını ve hastanedeki CTX-M-3 genotipini araştırmak için toplam 157 *E. coli* izolatından 54(%34,4)'ü GSBL pozitif 50 GSBL pozitif *E. coli* suşlarının 42 (%84)'si CTX-M-3 geni için pozitif tespit etmişlerdir.[133]

Liao ve arkadaşları'nın 2016 yılında yaptığı çalışmada, Çindeki 9 hastaneden 2012-2013 yıllarında intraabdominal enfeksiyonlara neden olan 167 GSBL pozitif *E.coli* ve *K. penumoniae* suşlarını moleküler düzeyde (PCR ve PFGE) incelemişler ve 167 GSBL pozitif *E. coli* suşunda %62.3 CTX-M pozitiflik ve CTX-M-15 in hem *E. coli* hem *K. pneumoniae* suşlarında en yaygın genotip olduğunu bildirmişlerdir. Bunun %28.7 *E. coli* de saptanmıştır.[134]

El bouamri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Fas'ta bir üniversite hastanesinde 2010-2012 yılları arasında 3 yıllık retrospektif çalışmada İYE'lerin %63'ünde *E. coli* tespit edilmiş ve 2012'de tüm üriner *Enterobacteriacea* izolatlarının %6'sının GSBL pozitif *E.coli* prevalansına sahip olduğu görülmüştür. GSBL üreten CTX-M ise %70 oranında olduğunu bildirmişlerdir. İlk kez üriner *E.coli* arasında en yaygın CTX-M'i rapor etmişlerdir.[135]

Seyedjavadi ve arkadaşlarının 2015 yılındaki 11 aylık çalışmada, İYE hastalarının GSBL pozitif *E. coli* sıklığı % 40.8, blaCTX-M gen frekansının çarpıcı şekilde yüksek (%74) tespit etmişlerdir. Portekizde üç hastanede 2007'de yapılan bir çalışmada ise CTX-M (%76), İYE'ler arasında yaygın bulunmuştur. Türkiye'de 2013 de yapılan bir başka çalışmada GSBL pozitif *E.coli* izolatları arasında CTX-M'nin %83.18 ile en yaygın olduğunu tespit etmişlerdir. [136]

Bangladeş'de 2016 yılında yapılan bir çalışmada semptomatik idrar yolu enfeksiyonu vakalarından 800 idrar örneği 138 Gram negatif üropatojenin 45(% 32.6)'inin GSBL pozitif olduğu 36(%80)'sını blaCTX-M-15 oluşturduğunu saptamışlardır.[137]

Bulgaristan'da 1996–2003 yılları arasında *Enterobacteriaceae* ye ait 442 GSBL pozitif izolat 9 tıp kurumunda toplanmış, 2001'de ilk CTX-M tipi % 16,7, 2002'de % 53,6'ya ve2003'te % 65,2'ye arttığı yapılan çalışmada GSBL pozitifler arasında *E. coli* %34.8 oranında bulunmuş. *E. coli'*de %64.5 CTX-M- pozitif tespit etmişler. CTX-M-3 veya CTX-M-15 GSBL kombinasyonları şeklinde olduğu saptanmıştır. CTX-M-15 ve CTX-M-3 yedi merkezde en yaygın GSBL olduğu bildirilmiştir.[138]

Kore'de 2005 yılındaki bir çalışmada CTX-M-15 prevalansı %17.0 iken 2008 yılında yapılan çalışmada, GSBL pozitif *E. coli*'nin toplum ve hastane kaynaklı 142 izolattan 139'u CTX-M-tipi GSBL bunun %38.1'i CTX-M-15 olduğu belirlenmiştir.

2007 yılında SENTRY ve Meropenem Yıllık Duyarlılık Testi Bilgi Toplama (MYSTIC) Antimikrobiyal Sürveyans Programlarında toplanan 1596 *E. coli* izolatın 118(% 7,4)'i GSBL-pozitif, 34 izolat blaCTX-M-15 geni taşıdığı rapor edilmiştir. [139]

Bizim çalışmamız da çeşitli örneklerden toplanan 1262 *E. coli* izolatının 619 (%49.1)'u GSBL pozitif iken 643'ü (%50.9) GSBL negatifti. Bunlar arasında 1262 örneğin 860(%68.1)'ı *E. coli* olarak birinci sırada tespit edilmiştir. Bu sonuçlar diğer literatür bulgularıyla uyumludur.

Çalışmaya Vitek 2 sistemiyle GSBL pozitif tespit edilen *E. coli* idrar izolatları çift disk sinetrji testine tabi tutulup onunla da pozitiflik elde edilen 85 *E.coli* izolatı çalışmaya dahil edildi. Bu suşların 59(%69.4)'unda CTX-M- β-laktamazı tespit edilirken bunun 25(%29.4)'inde CTX-M-15, 34(%40)'ünde CTX-M-3 pozitif olarak tespit edildi. Literatür bulgularına baktığımızda ve yapılan çalışmalara baktığımızda genellikle CTX-M-15, CTX-3'e göre daha yüksek oranlarda tespit edilmiştir. Malini'nin yapmış olduğu çalışmada ise idrar yollarından izole edilen GSBL pozitif *E. coli* suşlarının %84'ünde en sık olarak CTX-M-3'ü tespit etmiştir. Bizim çalışmamızda da CTX-M-3'ü CTX-M-15'e göre daha yüksek oranda tespit ettik.

Dünya çapında *E. coli* ST131 klonu coğrafi bölgeye ve konakçı popülasyona göre değişmekte olup, ST131'in *E. coli* izolatları arasında %12.5-30 arasında olduğu, florokinolona dirençli suşların ise yaklaşık %80'ini oluşturduğu rapor edilmiştir.[142]

Can ve arkadaşları akut sistitli hastalardan 2011'de alınan 107 *E.coli* izolatının 26(%24.3)'sını ST131 klonu 59(%55.1)'unun GSBL oluşturduğu bu GSBL pozitif izolatların 18(%31)'inin ST131 klonuna ait olduğunu bildirmişlerdir Yine aynı araştırıcıya göre ST131 klonunun prevalansı bölgeye göre farklı olup Fransa'da %4, ABD'de %27 iken Türkiye'de %12 olduğunu rapor etmiştir.[140]

Yine aynı araştırıcının yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise, İYE etkeni 294 *E. coli* izolatının %12'sinde ST131 klonunu tespit etmişler.[139]

Türkiye'de ilk kez 2008 yılında, Yumuk ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada GSBL pozitif 17 *E. coli* izolatından birinin ST131 klonu olduğu bildirilmiştir.[130]

Demirci ve arkadaşlarının 2018 yılında İYE'de izole edilen *E. coli* izolatlarında %22 oranında ST131 klonunu tespit etmişlerdir.[146]

Çizmeci ve arkadaşlarının 2017'ki çalışmasında ise 251 idrar E. coli izolatının 91(%36.3)'ünün ST131 klonuna sahip olduğunu bildirmişlerdir.[159]

Avustralya'da kadınlarda idrardan izole edilen E. coli,'lerin sistitte %13 piyelonefrit olgularında %30 oranında ST131 klonu tespit edilmiştir.

Sherchan ve arkadaşlarının Nepal'de 2013 yılında yaptığı 6 aylık bir çalışmada %51.4'ün ST131 klonunu tespit etmişlerdir.[156]

Japonya'da ulusal bir anket ile 2002'den 2003'e kadar GSBL pozitif *E. coli*'nin %21'inde ST131 klonu tespit edilmiş.[140]

Kamboçya'da İYE'lerin % 27'sinde ST131 pozitif bulunmuştur. Avustralya'da *E. coli* izolatları arasında % 31 ST131 bulunmuştur. İkinci bir çalışmada ise, hastane ve toplum kaynaklı izolatlarda florokinolona dirençli izolatların%35'inin ST131 taşıdığı bulunmuştur.

Afrika'da ST131'in varlığına ilişkin çok az veri bulunmaktadır. Güney Afrika, Cape Town'da GSBLpozitif *E. coli* izolatların %43'ü ST131 bulunmuştur. Orta Afrika Cumhuriyeti'nde ise ST131'in %50 tespit edilmiştir.[141]

Sapper ve arkadaşlarının ABD'de 2010 yılında ST131'i %73 tespit etmişlerdir.[105]

Kudinha ve arkadaşları yine Avustralya'da piyelonefrit olgularında *E. coli*'lerin %33'ünde ST131 klonunu tespit etmişlerdir.

Johnson ve arkadaşlarının ABD'de yaptığı bir çalışmada ise GSBL pozitif E.coli suşlarının üçte ikisinde ST131 klonunu tespit etmişlerdir.

Gürpınar'ın çalışmasında 157 *E. coli* kan izolatlarında ST131 klonunun 156(%99.4)'sında bulunup yüksek olduğu görülmüştür.[154] Bizim çalışmamızda ise idrar yolundan izole edilen GSBL pozitif 85 *E. coli* suşunun %27.1'inde ST131 klonunu tespit ettik. Bu sonuç Türkiye'deki ve yurtdışındaki oranlarla kıyaslandığında tespit edilen oranlar arasında olduğu görülmektedir.

Türkiye'de 2000'li yılların başında GSBL pozitif *E.coli* izolatlarının %70'inin florokinolonlara direnç gösterdiği bildirilmiştir. Türkiye *E. coli* izolatlarında antimikrobiyal direnç oranları yüksek bir ülkedir. Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı (2016) yıllık raporunda *E. coli* izolatları için 3.kuşak sefalosporinlere ve florokinolonlara karşı %48 duyarlılık bildirilmiştir.[142]

Aykan ve arkadaşlarının 1996-2012 yıllarındaki bir meta-analiz çalışmasında da Türkiye'deki GSBL ve florokinolon, trimetoprim/sulfametoksazol direnç oranlarında artış olduğunu rapor etmişlerdir.[143]

Ögedey ve arkadaşlarının 2009'da çeşitli örneklerdeki GSBL pozitif *E. coli* izolatları sefoksitin ve karbapenem direncine rastlanmamış GSBL pozitif izolatların, diğer izolatlara göre, siprofloksasin, levofloksasin, amoksisilin/klavulanik asit, piperasilin/tazobaktam, gentamisin, amikasin, tobramisin, trimetoprim-sülfometoksazol ve nitrofurantoin direncinde anlamlı fark bulmuşlardır ($p<0.001$).[144]

Gönüllü ve arkadaşlarının İstanbul'da yaptıkları çalışmada GSBL pozitif *E. coli* izolatlarında siprofloksasine karşı yüksek oranda direnç (%80.4) saptarken en etkili antibiyotiğin amikasin (%91.9) ve imipenem (%100) olduğunu belirtmişlerdir.[145]

Bizim çalışmamızda da GSBL pozitif ve GSBL negatif *E. coli* suşlarını karşılaştırdığımızda siprofloksasin direnci GSBL pozitif suşlarda %54.1 iken GSBL negatif suşlarda %27.1 olarak tespit edilmiştir. GSBL pozitif suşlarımızda sefiksim, seftriakson, sefuroksimde direnç %100 tespit edilirken bunu %98.8'lik direnç oranıyla ampisilin takip etmiştir. En yüksek hassasiyet imipenem (%100)'de görülürken bunu %98.8'le ertapenem, %98.5 ile meropenem %96.2 ile fosfomisin ve %94.8 ile nitrofurantoin takip etmiştir. GSBL negatif suşlarda imipenem %100'lük hassasiyet oranıyla birinci sırada görülürken bunu %98.8 ile meropenem ve nitrofurantoin, %97.6 ile de ertapenem ve amikasin takip etmiştir. Bunun yanısıra sefalosporinlerde ki hassasiyet oranı ise %85.9-%100 arasında tespit edilmiştir. GSBL pozitif ve GSBL negatif *E.coli'*lerin direnç durumları karşılaştırıldığında ertapenem, fosfomisin, imipenem, meropenem ve nitrofurantoin dışındaki diğer antibiyotiklerde anlamlı fark tespit edilmiştir.($P<0.05$)

Park ve arkadaşlarının Kore'de 2005'te yaptıkları bir çalışmada hastane ve toplum kökenli izolatlarda CTX-M tipi GSBL pozitif izolatlarda siprofloksasin %75.5, gentamisin %65.5, trimetoprim sulfametoksazol %64.0, piperasilin tazobaktam %23.7 ve amikasine %10.1 direnç tespit etmişlerdir.[146]

Demirci ve arkadaşlarının 2018'de toplum ve hastane kaynaklı 101 İYE'de ST131 ile CTX-M-15 β-laktamazları çalışmasında ayaktan ve yatan hastalarda en etkili antibiyotiği fosfomisin ve nitrofurantoin bulmuşlardır. Duyarlılıklarına göre karbapenemler, nitrofurantoin, amikasin ve fosfomisini en iyi tedavi seçeneği olarak tespit etmişlerdir.[147]

Can ve arkadaşlarının yine 2015'teki çalışmasında antibiyotik CTX-M-15 β-aktamazlarının direnç oranlarında siprofloksasin %39, trimetoprim/sulfametoksazol %44, sefuroxime %25 direnç saptanırken fosfomisin ve karbapenemlere karşı direnç saptamamışlardır. [148]

Bizim çalışmamızda CTX-M-3 veya CTX-M-15'e sahip olan *E.coli* suşlarında sefiksim, seftazidim, seftriakson, sefuroksim gibi sefalosporinlere ve ampisiline %100 direnç tespit edilirken ertapenem ve imipeneme %100 meropeneme ise CTX-M-15'te

%100 CTX-M-3'te ise %96.9 oranında hassasiyet tespit edilmiştir. CTX-M-3 ve CTX-M-15'e sahip olan *E. coli'*lerin antibiyotik duyarlılıkları değerlendirildiğinde sadece amikasinde anlamlı fark tespit edilmiştir. CTX-M-15'e sahip olan *E. coli* suşlarının %92'si amikasine hassas iken %8'i dirençli bulunmuştur. Bu oran CTX-M-3'te sırasıyla %67.6 ve %32.4 olarak bulunmuştur.

Aktaş ve arkadaşları 2017 yılında idrarda GSBL pozitif *E.coli* ST131 izolatlarının tümü karbapenemler ve amikasine hassas iken siprofloksasine % 62.1, trimetoprim/sulfametoksazole %65.5 direnç saptamış. Siprofloksasine direncin ise ST131'de, ST131 olmayan izolatlara göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.[142]

Bir Çin üniversite hastanesinde 2014 ve 2015 yılları arasında klinik 700 ardışık *E. coli* izolatı toplanarak 700 klinik *E. coli* izolatından 83(% 11,6)'ü ST131 klonunun prevalansı bulunmuştur.[149]

Suudi Arabistan Riyad' da 2018 yılının Ocak ve Mart ayları arasında üçüncü basamak hastanede yatan hastaların idrarlarından *E. coli* izolatları arasında ST131 ve alt klonlarının prevalansını ve moleküler özellikleri araştırmasında, ST131'in %64.9'u GSBL pozitif tüm *E. coli* idrar izolatlarının %61.7'sini oluşturduğunu göstermiştir. Altmış izolatın 37(% 61.7)'si ST131 klonlarına aitti. Yerel olarak yüksek ST131 prevalansını göstermiştir. 100 klinik UPEC izolatların %33'ünün GSBL pozitif ve CTX-M-15'in baskın olduğunu göstermiştir. [150]

2008-2011 yılları arasında yapılan bir Japon anketinde GSBL pozitif *E. coli*'nin %52'sini ST131oluşturmuştur. 2008'deki rapordan bu yana hala dünya çapında izole edilmektedir. GSBL pozitif *E. coli,* negatiflere kıyasla kinolonlara karşı artan direnç göstermekte olup levofloksasin (LVFX) direnç oranı 2008'de %27 iken 2016'da %39'a yükselmiştir. [151]

Colpan ve arkadaşlarının 2011'de ABD'de idrardan izole ettiği ST131 klonuna sahip *E. coli'*lerde florokinolonlarda %78, TMP/SMX %56, gentamisine de %76 direnç tespit etmişlerdir. [152]

Çizmeci ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ST131 pozitif izolatlarda siprofloksasin direnci %78.2, olmayanlara göre %53.4 anlamlı derecede yüksek bulunmuş. Diğer antibiyotiklerde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını belirtmişlerdir.[153]

Nicolas ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada tipik olarak ST131 *E. coli* izolatlarının üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli ancak karbapenemlere duyarlı olduğunu bildirmiştir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda ise karbapenemlere dirençli ST131 suşlarının tanımlandığı bildirilmiştir.[101] [154]

Bizim çalışmamızda ST131 pozitif ve negatif *E. coli* izolatlarında karbapenem (imipenem ve meropeneme) direnci tespit edilmemiştir. Yine ST131 pozitif ve negatif suşların tamamında sefiksim, seftazidim, seftriakson ve sefuroksim gibi sefalosporinlerle birlikte ampisiline %100 oranında direnç tespit edilmiştir. ST131 klonuna sahip suşlarda nitrofurantoinde de %100 oranında hassasiyet tespit edilirken siprofloksasinde %95.7 oranında direnç tespit edilmiştir.

Colpan'ın ST131 pozitif suşlardaki TMP/SMX %56 iken bizde daha yüksek %72.7 olarak bulunmuştur. ST131 pozitif ve negatif suşlara uyguladığımız antibiyotik duyarlılık testlerini değerlendirdiğimizde amikasin, AMC, sefoksitin, siprofloksasin, gentamisin ve TPZ'de anlamlı fark görülmüştür.[152]

Gürpınar'ın çalışmasında ST131 ile enfekte hastalar sıklıkla hastanede uzun süreli yatış ve bakteriyemi öncesi antibiyotik kullanım öyküsüne sahip immünsuprese hastalar olduğu belirtilmiştir.[155]

D'Andrea'nın çalışmasında kan dolaşımı enfeksiyonunda CTX-M'in diyabet, İYE, böbrek hastalığı, son zamanlarda antibiyotik kullanımının yaygın risk faktörleri ile ölüm oranlarının %20-30 arasında olduğu bildirilmiştir.[156]

GSBL pozitif *E. coli* suşlarının %38'den fazlasının poliklinikten izole edilmesi Nepal'de topluluklar arasında CTX-M üreten *E.coli* yayılımını göstermiştir. Altta yatan koşullar, hastalığın ciddiyeti ve hastanede kalma gibi risk faktörü olmamasına rağmen CTX-M β-laktamaz enzimleri toplumda yayılabileceğini düşünüp bu konuda dikkatli olunmalıdır. Kombine ağızdan alınan antibiyotiklere karşı yüksek direnç toplumda izole edilmiş GSBL pozitif *E. coli* suşları için bir risk faktörüdür.[157]

Bizim çalışmamızdaki CTX-M-3 ve CTX-M-15 GSBL'lere sahip *E. coli* suşlarının oluşturduğu risk faktörlerinden en çok sistemik enfeksiyon bulgusunun olması 50(%58.9) ile 3 ay içinde antibiyotik kullanımı 66(%77.6) diğer risk faktörlerinden yüksekti. altta yatan hastalığı olanlarda en fazla ürolojik bozukluk 40(% 47.0), solid malign hastalık 10(%11.7), nörolojik bozukluk 6(%7.0) dikkat çekiciydi. Görüldüğü gibi hastaların çoğunda önemli bir altta yatan hastalık ve antibiyotik kullanımı mevcuttu. Bu da izole edilen etken patojende direnç potansiyeline neden olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) *Enterobacteriaceae*'de sık görülmektedir. Özellikle *E.coli* serotip O25b: H4, filogenetik grup B2 ve sekans tipi 131 (ST131) GSBL tipi CTX-M-15 ile karakterize edilen küresel olarak yayılan uluslararası bir klon grubu çoklu ilaç direnciyle (MDR) gelişen enfeksiyonların tedavisini de güçleştirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2015 raporunda, *E. coli'*nin yaklaşık yılda 550 milyon hastalığa ve bunların 230.000'inin ölümle sonuçlandığını açıklamıştır.

Son yıllarda toplum ve hastane kaynaklı GSBL pozitif *E.coli* prevalansında dramatik bir artış olmaktadır.

1- Bu çalışma sonunda Vitek 2 otomatize sistem ile 1262 toplam *E. coli* izolatının 860(%68.1)'ı idrar, 107(%8.4)'si kan, 68(%5.3)'i sürüntü, 52(%4.1)'si balgam, 39(%3.0)'u püy, 22(%1.7)'si vajen ve 114(%9.0)'ü diğer örneklerden izole edilerek tanımlandığı, toplam 1262 *E. coli* izolatının 619 (%49.1)'u GSBL pozitif, 643 (%50.9)'ü GSBL negatiftir.

2- GSBL pozitif *E. coli* (619) izolatlarının izole edildiği örneklerin 419 (%67.7)'u idrar iken bunu 53 (%8.5)'ü kan, 43 (%6.9)'ü sürüntü izolatlarının takip ettiği,

3- Vitek 2 hem de çift disk sinerji testi ile GSBL pozitif 85 *E. coli* suşunun 28(%32.9)'i erkek, 57(%67.1)'si kadın hastaya aitti. Bu hastaların 24(%28.2)'ü poliklinik, 61(%71.8)'i servis hastası olduğu.

4- İdrardan izole edilen toplam 85 GSBL pozitif *E coli* izolatının 25(%29.4)'i CTX-M-15'i pozitifken, 34(%40)'ü CTX-M-3 pozitif olup, toplam 59(%69.4)'u CTX-M genleri için pozitif; CTX-M-3, CTX-M-15'e göre daha yüksek oranda saptandığı, bu izolatların 26(%30.6)'sında CTX-M-3 ve CTX-M-15 β-laktamazlarından herhangi birine rastlanılmadığı,

5- Seksen beş GSBL pozitif *E. coli* suşunun 23(%27.1)'ünde ST131 klonu tespit edilirken 62(%72.9)'sinde ise ST131 klonuna rastlanılmadığı

6- GSBL pozitif ve GSBL negatif *E. coli* suşlarını karşılaştırdığımızda siprofloksasin direnci GSBL pozitif suşlarda %45.9 iken GSBL negatif suşlarda %27.1 olarak tespit edilmiştir. GSBL pozitif suşlarımızda sefiksim, seftriakson, sefuroksimde direnç %100 tespit edilirken bunu %98.8'lik direnç oranıyla

ampisilin takip etmiştir. En yüksek hassasiyet imipenem (%100)'de görülürken bunu %98.8'le ertapenem, %98.5 ile meropenem %96.2 ile fosfomisin ve %94.8 ile nitrofurantoin takip etmiştir. GSBL negatif suşlarda imipenem %100'lük hassasiyet oranı ile birinci sırada görülürken bunu %98.8 ile meropenem ve nitrofurantoin, %97.6 ile de ertapenem ve amikasin takip etmiştir. Bunun yanısıra sefalosporinlerde ki hassasiyet oranı ise %85.9-%100 arasında tespit edilmiştir. GSBL pozitif ve GSBL negatif *E.coli'*lerin direnç durumları karşılaştırıldığında AMC, ampisilin, sefiksim, seftazidim, seftriakson, sefuroksim, sefuroksim aksetil, siprofloksasin, gentamisin, TPZ ve TMP/SMX gibi antibiyotiklerin GSBL pozitif suşlarda, GSBL negatif suşlara göre anlamlı oranda daha dirençli oldukları saptanmıştır (P<0.001)

7- CTX-M-3 veya CTX-M-15'e sahip olan *E.coli* suşlarında sefiksim, seftazidim, seftriakson, sefuroksim gibi sefalosporinlere ve ampisiline %100 direnç tespit edilirken ertapenem ve imipeneme %100 meropeneme ise CTX-M-15'te %100 CTX-M-3'te ise %96.9 oranında hassasiyet tespit edilmiştir. CTX-M-3 ve CTX-M-15'e sahip olan *E. coli'*lerin antibiyotik duyarlılıkları değerlendirildiğinde sadece amikasinde anlamlı fark (P=0.026) tespit edilmiştir. CTX-M-15'e sahip olan *E. coli* suşlarının %92'si amikasine hassas iken %8'i dirençli bulunmuştur. Bu oran CTX-M-3'te sırasıyla %67.6 ve %32.4 olarak bulunduğu,

8- ST131 pozitif ve negatif *E. coli* izolatlarında karbapeneme (imipenem ve meropeneme) direnç tespit edilmemiştir. Yine ST131 pozitif ve negatif suşların tamamında sefiksim, seftazidim, seftriakson ve sefuroksim gibi sefalosporinlerle birlikte ampisiline %100 oranında direnç tespit edilmiştir. ST131 klonuna sahip suşlarda nitrofurantoinde de %100 oranında hassasiyet tespit edilirken siprofloksasinde %95.7 oranında direnç tespit edildiği, ST131 pozitif ve negatif suşların antibiyotik duyarlılıkları karşılaştırıldığında amikasin, AMC, sefoksitin, siprofloksasin, gentamisin, TPZ'de anlamlı fark bulunmuştur (P<0.05).

9- CTX-M-3 ve CTX-M-15 GSBL'lere sahip *E. coli* suşlarının izole edildiği hastalarda risk faktörlerinden en çok sistemik enfeksiyon bulgusunun olması 50(%58.9) ile 3 ay içinde antibiyotik kullanımı 66(%77.6) ile diğer risk faktörlerinden yüksek olduğu,

10- CTX-M-3 ve CTX-M-15 β-laktamazlara sahip hastaların altta yatan hastalıkları en fazla Ürolojik Bozukluk 40(%47.0) olup bunu Solid Malign Hastalığı 10(%11.7), Nörolojik Hastalık 6(%7.0) oranında takip ettiği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. O'Brien, V.P., et al., *Drug and Vaccine Development for the Treatment and Prevention of Urinary Tract Infections.* Microbiol Spectr, 2016. **4**(1).

2. Nicolas-Chanoine, M.H., X. Bertrand, and J.Y. Madec, *Escherichia coli ST131, an intriguing clonal group.* Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(3): p. 543-74.

3. Begum, N. and S.M. Shamsuzzaman, *Emergence of CTX-M-15 producing E. coli O25b-ST131 clone in a tertiary care hospital of Bangladesh.* Malays J Pathol, 2016. **38**(3): p. 241-249.

4. Amaya, E., et al., *Antibiotic resistance patterns of intestinal Escherichia coli isolates from Nicaraguan children.* J Med Microbiol, 2011. **60**(Pt 2): p. 216-222.

5. Pitout, J.D.D. and T.J. Finn, *The evolutionary puzzle of Escherichia coli ST131.* Infect Genet Evol, 2020. **81**: p. 104265.

6. Szijártó, V., et al., *Diagnostic potential of monoclonal antibodies specific to the unique O-antigen of multidrug-resistant epidemic Escherichia coli clone ST131-O25b:H4.* Clin Vaccine Immunol, 2014. **21**(7): p. 930-9.

7. Sanders, C.C., K.S. Thomson, and P.A.J.I.d.c.o.N.A. Bradford, *Problems with detection of beta-lactam resistance among nonfastidious gram-negative bacilli.* 1993. **7**(2): p. 411-424.

8. Bajpai, T., et al., *Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital.* Avicenna J Med, 2017. **7**(1): p. 12-16.

9. Harada, S., Y. Ishii, and K.J.K.J.L.M. Yamaguchi, *Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy.* 2008. **28**(6): p. 401-12.

10. Schembri, M.A., et al., *Molecular Characterization of the Multidrug Resistant Escherichia coli ST131 Clone.* Pathogens, 2015. **4**(3): p. 422-30.

11. Shaik, S., et al., *Comparative Genomic Analysis of Globally Dominant ST131 Clone with Other Epidemiologically Successful Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli (ExPEC) Lineages.* 2017. **8**(5): p. e01596-17.

12. Blanco, J., et al., *Four Main Virotypes among Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Isolates of Escherichia coli O25b:H4-B2-ST131: Bacterial, Epidemiological, and Clinical Characteristics.* 2013. **51**(10): p. 3358-3367.

13. Mandomando, I., et al., *Escherichia coli ST131 clones harbouring AggR and AAF/V fimbriae causing bacteremia in Mozambican children: Emergence of new variant of fimH27 subclone.* PLoS Negl Trop Dis, 2020. **14**(5): p. e0008274.

14. Katouli, M., *Population structure of gut Escherichia coli and its role in development of extra-intestinal infections.* Iran J Microbiol, 2010. **2**(2): p. 59-72.

15. Koga, V.L., et al., *Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from human blood culture in Brazil.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 465054.

16. Cyoia, P.S., et al., *Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolates from Brazil.* J Infect Dev Ctries, 2015. **9**(10): p. 1068-75.

17. Rogers, B.A., H.E. Sidjabat, and D.L. Paterson, *Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain.* J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(1): p. 1-14.

18. Szijártó, V., et al., *Bactericidal monoclonal antibodies specific to the lipopolysaccharide O antigen from multidrug-resistant Escherichia coli clone ST131-O25b:H4 elicit protection in mice.* Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(6): p. 3109-16.

19. Topçu, A.W., G. Söyletir, and M. Doğanay, *İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. 2002: Nobel Tıp.

20. Özkuyumcu, C.M., et al., *Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı.* 2009: p. 76-93.

21. Koçyiğit Kalcan, S., *Yoğun bakım hastalarının idrar kültürlerinden izole edilen escherichia coli suşlarında fimh single nükleotid polimorfizmi araştırılması*. 2018, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/Tıp Fakültesi/Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim ….

22. Willke Topçu, A., G. Söyletir, and M.J.Y.O.A.V.H.n.B. Doğanay, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi.* 2002: p. 820-834.

23. Eisenstein, B.I. and G.W. Jones, *The spectrum of infections and pathogenic mechanisms of Escherichia coli.* Adv Intern Med, 1988. **33**: p. 231-52.

24. Thumbikat, P., et al., *Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection.* PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000415.

25. Mulvey, M.A., *Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli.* Cell Microbiol, 2002. **4**(5): p. 257-71.

26. Hagberg, L., et al., *Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic Escherichia coli of human origin.* Infect Immun, 1983. **40**(1): p. 273-83.

27. Schembri, M.A., et al., *Capsule and fimbria interaction in Klebsiella pneumoniae.* Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 4626-33.

28. Leffler, H. and C. Svanborg-Edén, *Glycolipid receptors for uropathogenic Escherichia coli on human erythrocytes and uroepithelial cells.* Infect Immun, 1981. **34**(3): p. 920-9.

29. Godaly, G., et al., *Innate defences and resistance to gram negative mucosal infection.* Adv Exp Med Biol, 2000. **485**: p. 9-24.

30. Melican, K., et al., *Uropathogenic Escherichia coli P and Type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction.* 2011. **7**(2): p. e1001298.

31. Johnson, J.R., *Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection.* Clin Microbiol Rev, 1991. **4**(1): p. 80-128.

32. Bien, J., O. Sokolova, and P. Bozko, *Role of Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage.* Int J Nephrol, 2012. **2012**: p. 681473.

33. Torres, A.G., et al., *TonB-dependent systems of uropathogenic Escherichia coli: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse.* 2001. **69**(10): p. 6179-6185.

34. Taylor, P.J.C.s., *An antibactericidal factor in the serum of two patients with infections of the upper urinary tract.* 1972. **43**(1): p. 23-30.

35. Murray, P.R., et al., *Tıbbi mikrobiyoloji*. 2010: Atlas Kitapçılık.

36. Groisman, E.A. and H. Ochman, *Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps.* Cell, 1996. **87**(5): p. 791-4.

37. Hacker, J., et al., *Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal Escherichia coli isolates.* Microb Pathog, 1990. **8**(3): p. 213-25.

38. Paterson, D.L. and R.A. Bonomo, *Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update.* Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(4): p. 657-86.

39. Croxen, M.A. and B.B. Finlay, *Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity.* Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(1): p. 26-38.

40. Manges, A.R., et al., *Global Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli (ExPEC) Lineages.* Clin Microbiol Rev, 2019. **32**(3).

41. Doumith, M., et al., *Rapid Identification of Major Escherichia coli Sequence Types Causing Urinary Tract and Bloodstream Infections.* 2015. **53**(1): p. 160-166.

42. Johnson, J.R., et al., *Escherichia coli sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant E. coli infections in the United States.* Clin Infect Dis, 2010. **51**(3): p. 286-94.

43. Pitout, J.D., T.J.J.I. Finn, Genetics, and Evolution, *The evolutionary puzzle of Escherichia coli ST131*. 2020. **81**: p. 104265.

44. Munita, J.M. and C.A. Arias, *Mechanisms of Antibiotic Resistance.* Microbiol Spectr, 2016. **4**(2).

45. Shaikh, S., et al., *Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment.* 2015. **22**(1): p. 90-101.

46. Thomas, C.M. and K.M. Nielsen, *Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria.* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(9): p. 711-21.

47. Samaha-Kfoury, J.N. and G.F.J.B. Araj, *Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases.* 2003. **327**(7425): p. 1209-1213.

48. Bush, K., R.B.J.A.A. Sykes, and Chemotherapy, *Methodology for the study of beta-lactamases.* 1986. **30**(1): p. 6.

49. Siu, L.-K.J.J.o.M., Immunology, and Infection, *Antibiotics: action and resistance in gram-negative bacteria*. 2002. **35**(1): p. 1-11.

50. Livermore, D.M., *beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance.* Clin Microbiol Rev, 1995. **8**(4): p. 557-84.

51. Genişlemiş spektrumlu β-laktamazlar, G.D.J.H.T.D., *Temel Tıptan Kliniğe.* 2002. **33**: p. 102-9.

52. ÇİFTCİ, A. and A.J.T.K.V.B.-F.v.T.-Ö.K. AKSOY, *Antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları.* 2015. **1**(2): p. 1-10.

53. Forbes, B.A., et al., *Principles of antimicrobial action and resistance.* 2002: p. 214-228.

54. Ambler, R.P., et al., *A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases.* Biochem J, 1991. **276 (Pt 1)**(Pt 1): p. 269-70.

55. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros, *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.* Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(6): p. 1211-33.

56. Bush, K., G.A.J.A.a. Jacoby, and chemotherapy, *Updated functional classification of β-lactamases.* 2010. **54**(3): p. 969-976.

57. Jones, R.N., et al., *Inducible β-lactamase-mediated resistance to third-generation cephalosporins.* 1997. **3**: p. s7-s20.

58. Pitout, J.D. and K.B.J.T.L.i.d. Laupland, *Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern.* 2008. **8**(3): p. 159-166.

59. Livermore, D.M.J.C.m.r., *beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance.* 1995. **8**(4): p. 557-584.

60. Bridges, B.A., *Hypermutation in bacteria and other cellular systems.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001. **356**(1405): p. 29-39.

61. Bradford, P.A.J.C.m.r., *Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat.* 2001. **14**(4): p. 933-951.

62. Ghafourian, S., et al., *Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology.* 2015. **17**(1): p. 11-22.

63. Gupta, V.J.I.J.o.M.R., *An update on newer beta-lactamases.* 2007. **126**(5): p. 417.

64. Stürenburg, E., et al., *A novel extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-23 with a P167T substitution in the active-site omega loop associated with ceftazidime resistance.* J Antimicrob Chemother, 2004. **54**(2): p. 406-9.

65. Bauernfeind, A., Y. Chong, and K. Lee, *Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery?* Yonsei Med J, 1998. **39**(6): p. 520-5.

66. Fam, N., et al., *CTX-M-15-producing Escherichia coli clinical isolates in Cairo (Egypt), including isolates of clonal complex ST10 and clones ST131, ST73, and ST405 in both community and hospital settings.* Microb Drug Resist, 2011. **17**(1): p. 67-73.

67. Bonnet, R., *Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes.* Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(1): p. 1-14.

68. Liao, K., et al., *Molecular characteristics of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae causing intra-abdominal infections from 9 tertiary hospitals in China.* 2017. **87**(1): p. 45.

69. Matsumoto, Y., et al., *Novel plasmid-mediated beta-lactamase from Escherichia coli that inactivates oxyimino-cephalosporins.* 1988. **32**(8): p. 1243-1246.

70. Bauernfeind, A., et al., *A new plasmidic cefotaximase from patients infected with Salmonella typhimurium.* Infection, 1992. **20**(3): p. 158-63.

71. Bernard, H., et al., *A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes.* J Antimicrob Chemother, 1992. **29**(5): p. 590-2.

72. Barthélémy, M., et al., *Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of Klebsiella oxytoca.* 1992. **1122**(1): p. 15-22.

73. Ishii, Y., et al., *Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(10): p. 2269-75.

74. Bauernfeind, A., et al., *Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases.* Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(2): p. 509-13.

75. Gniadkowski, M., et al., *Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme.* Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(4): p. 827-32.

76. Bahar, G., et al., *A strain of Salmonella enterica serovar Virchow isolated in Turkey and carrying a CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase.* 2006. **18**(3): p. 307-310.

77. Pitout, J.D., et al., *Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community.* J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(1): p. 52-9.

78. Perez, F., et al., *The continuing challenge of ESBLs.* 2007. **7**(5): p. 459-469.

79. Brisse, S., et al., *Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes.* J Clin Microbiol, 2012. **50**(9): p. 2974-81.

80. Cantón, R. and T.M. Coque, *The CTX-M beta-lactamase pandemic.* Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(5): p. 466-75.

81. Hope, R., et al., *Efficacy of practised screening methods for detection of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae.* 2007. **59**(1): p. 110-113.

82. Kahlmeter, G.J.C.M. and Infection, *Breakpoints for intravenously used cephalosporins in Enterobacteriaceae—EUCAST and CLSI breakpoints.* 2008. **14**: p. 169-174.

83. Livermore, D. and P.J.J.o.A.C. Hawkey, *CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK.* 2005. **56**(3): p. 451-454.

84. Ensor, V., D. Livermore, and P.J.J.o.A.C. Hawkey, *A novel reverse-line hybridization assay for identifying genotypes of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases.* 2007. **59**(3): p. 387-395.

85. Peirano, G. and J.D.J.D. Pitout, *Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: update on molecular epidemiology and treatment options.* 2019. **79**(14): p. 1529-1541.

86. Kimura, S., et al., *Role of a mutation at position 167 of CTX-M-19 in ceftazidime hydrolysis.* Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(5): p. 1454-60.

87. Chen, Y., et al., *Atomic resolution structures of CTX-M beta-lactamases: extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability.* J Mol Biol, 2005. **348**(2): p. 349-62.

88. Cartelle, M., et al., *High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution.* Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(6): p. 2308-13.

89. Clermont, O., et al., *Rapid detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli encompassing the CTX-M-15-producing strains.* 2009. **64**(2): p. 274-277.

90. Le Gall, T., et al., *Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group Escherichia coli strains.* 2007. **24**(11): p. 2373-2384.

91. Dahbi, G., et al., *Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic Escherichia coli producing extended-spectrum β-lactamases.* 2013. **42**(4): p. 347-351.

92. Blanc, V., et al., *Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing Escherichia coli comprising O25b: H4 and O16: H5 ST131 strains.* 2014. **69**(5): p. 1231-1237.

93. Mathers, A.J., G. Peirano, and J.D.J.C.m.r. Pitout, *The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae.* 2015. **28**(3): p. 565-591.

94. Wirth, T., et al., *Sex and virulence in Escherichia coli: an evolutionary perspective.* Mol Microbiol, 2006. **60**(5): p. 1136-51.

95. Krogfelt, K.A., H. Bergmans, and P. Klemm, *Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of Escherichia coli type 1 fimbriae.* Infect Immun, 1990. **58**(6): p. 1995-8.

96. Johnson, J.R., et al., *Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of Escherichia coli.* J Infect Dis, 2013. **207**(6): p. 919-28.

97. Mathers, A.J., G. Peirano, and J.D. Pitout, *The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae.* Clin Microbiol Rev, 2015. **28**(3): p. 565-91.

98. Russo, T.A. and J.R. Johnson, *Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC.* J Infect Dis, 2000. **181**(5): p. 1753-4.

99. Nicolas-Chanoine, M.H., et al., *Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15.* J Antimicrob Chemother, 2008. **61**(2): p. 273-81.

100. Johnson, J.R., et al., *Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic Escherichia coli from retail chicken products.* 2003. **47**(7): p. 2161-2168.

101. Nicolas-Chanoine, M.-H., X. Bertrand, and J.-Y.J.C.m.r. Madec, *Escherichia coli ST131, an intriguing clonal group.* 2014. **27**(3): p. 543-574.

102. Nicolas-Chanoine, M.-H., et al., *Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25: H4-ST131 producing CTX-M-15.* 2008. **61**(2): p. 273-281.

103. Johnson, J.R., et al., *Clonal relationships and extended virulence genotypes among Escherichia coli isolates from women with a first or recurrent episode of cystitis.* J Infect Dis, 2001. **183**(10): p. 1508-17.

104. Weissman, S.J., et al., *High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic Escherichia coli.* Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(5): p. 1353-60.

105. Adams-Sapper, S., et al., *Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and-resistant Escherichia coli isolates from bloodstream infections.* 2013. **57**(1): p. 490-497.

106. Johnson, J.R., et al., *Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of Escherichia coli.* 2013. **207**(6): p. 919-928.

107. Kara, M., et al., *Evaluation of Risk Factors in Community-Acquired Urinary Tract Infections Caused by Extended Spectrum [beta]-Lactamase-Producing Escherichia coli/Genislemis Spektrumlu [beta]-Laktamaz Ureten Escherichia coli'nin Etken Oldugu Toplum Kokenli Uriner Sistem Infeksiyonlarinda Risk Faktorlerinin Degerlendirilmesi.* 2020. **33**(1): p. 55-62.

108. Blanco, J., et al., *Four main virotypes among extended-spectrum-β-lactamase-producing isolates of Escherichia coli O25b: H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics.* 2013. **51**(10): p. 3358-3367.

109. Mora, A., et al., *Recent emergence of clonal group O25b: K1: H4-B2-ST131 ibeA strains among Escherichia coli poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates.* 2010. **76**(21): p. 6991-6997.

110. Mora, A., et al., *Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 Escherichia coli clinical isolates belonging to serotypes O25b: H4 and O16: H5 are associated to specific virotypes.* 2014. **9**(1): p. e87025.

111. Clermont, O., et al., *The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups.* Environ Microbiol Rep, 2013. **5**(1): p. 58-65.

112. Clermont, O., et al., *Determination of Escherichia coli O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia.* 2007. **57**(2): p. 129-136.

113. Weissman, S.J., et al., *High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic Escherichia coli.* 2012. **78**(5): p. 1353-1360.

114. Carattoli, A., *Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(6): p. 2227-38.

115. Villa, L., et al., *Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants.* J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(12): p. 2518-29.

116. Johnson, T.J., et al., *Separate F-Type Plasmids Have Shaped the Evolution of the H30 Subclone of Escherichia coli Sequence Type 131.* mSphere, 2016. **1**(4).

117. Stoesser, N., et al., *Evolutionary History of the Global Emergence of the Escherichia coli Epidemic Clone ST131.* mBio, 2016. **7**(2): p. e02162.

118. Dobrindt, U., *(Patho-)Genomics of Escherichia coli.* Int J Med Microbiol, 2005. **295**(6-7): p. 357-71.

119. Dhanji, H., et al., *Molecular epidemiology of fluoroquinolone-resistant ST131 Escherichia coli producing CTX-M extended-spectrum β-lactamases in nursing homes in Belfast, UK.* 2011. **66**(2): p. 297-303.

120. Menezes, M.R. and J.B. Sweasy, *Mouse models of DNA polymerases.* Environ Mol Mutagen, 2012. **53**(9): p. 645-65.

121. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction.* Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.

122. Kanmogne, G.D., *Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR,* in *Current Laboratory Methods in Neuroscience Research*. 2014, Springer. p. 201-210.

123. Valasek, M.A. and J.J. Repa, *The power of real-time PCR.* Adv Physiol Educ, 2005. **29**(3): p. 151-9.

124. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction.* 2006. **27**(2-3): p. 95-125.

125. Hawkins, S.F. and P.C. Guest, *Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR.* Methods Mol Biol, 2017. **1546**: p. 125-133.

126. Zurfluh, K., et al., *Replicon typing of plasmids carrying blaCTX-M-15 among Enterobacteriaceae isolated at the environment, livestock and human interface.* Sci Total Environ, 2015. **521-522**: p. 75-8.

127. Dhanji, H., et al., *Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli and its CTX-M-15-like extended-spectrum beta-lactamases.* Int J Antimicrob Agents, 2010. **36**(4): p. 355-8.

128. Ramadan, A.A., et al., *Novel blaCTX-M variants and genotype-phenotype correlations among clinical isolates of extended spectrum beta lactamase-producing Escherichia coli.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 4224.

129. Bektaş, A., et al., *Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae suşlarının GSBL genlerinin araştırılması.* 2018. **23**(3): p. 116-23.

130. Yumuk, Z., et al., *Turkey: a further country concerned by community-acquired Escherichia coli clone O25-ST131 producing CTX-M-15.* 2008. **62**(2): p. 284-288.

131. Celik, A.D., et al., *CTX-M type extended spectrum β-lactamases in Escherichia coli isolates from community acquired upper urinary tract infections at a university in the european part of Turkey.* 2010. **43**(2): p. 163-167.

132. Chong, Y., et al., *Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae.* 2018. **61**: p. 185-188.

133. BHAT, M.A., et al., *The Occurrence of CTX-M3 Type Extended Spectrum Beta Lactamases among Escherichia Coli Causing Urinary Tract Infections in a Tertiary Care Hospital in Puducherry.* 2012. **6**(7).

134. Liao, K., et al., *Molecular characteristics of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae causing intra-abdominal infections from 9 tertiary hospitals in China.* 2017. **87**(1): p. 45-48.

135. Arsalane, L., et al., *Molecular characterization of extended spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli in a university hospital in Morocco, North Africa.* 2015. **21**(3): p. 161-166.

136. Seyedjavadi, S.S., M. Goudarzi, and F.J.J.o.A.D. Sabzehali, *Relation between blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genes and acute urinary tract infections.* 2016. **5**(1): p. 71-76.

137. Shamsuzzaman, S.J.T.M.j.o.p., *Emergence of CTX-M-15 producing E. coli O25b-ST131 clone in a tertiary care hospital of Bangladesh.* 2016. **38**(3): p. 241.

138. Markovska, R., et al., *Extended-Spectrum β-Lactamase–Producing Enterobacteriaceae in Bulgarian Hospitals.* 2008. **14**(2): p. 119-128.

139. Johnson, J.R., et al., *Escherichia coli sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant E. coli infections in the United States.* 2010. **51**(3): p. 286-294.

140. Can, F., et al., *The clinical impact of ST131 H30-Rx subclone in urinary tract infections due to multidrug-resistant Escherichia coli.* 2016. **4**: p. 49-52.

141. Rogers, B.A., H.E. Sidjabat, and D.L.J.J.o.A.C. Paterson, *Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain.* 2011. **66**(1): p. 1-14.

142. Aktaş, E., et al., *A first insight into Escherichia coli ST131 high-risk clone among extended-spectrum beta-lactamase-producing urine isolates in istanbul with the use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry and real-time PCR.* 2017. **23**(8): p. 1032-1036.

143. Aykan, S.B. and I.H.J.M.b. Ciftci, *Antibiotic resistance patterns of Escherichia coli strains isolated from urine cultures in Turkey: a meta-analysis.* 2013. **47**(4): p. 603-618.

144. Ögedey, E.D., et al., *Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Üreten Escherichia coli ve Klebsiella spp. İzolatlarında CTX-M Enzimlerinin Belirlenmesi.* 2016.

145. Gonullu, N., et al., *Dissemination of CTX-M-15 β-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of Escherichia coli in a university hospital in Istanbul, Turkey.* 2008. **46**(3): p. 1110-1112.

146. Park, S.H., et al., *Molecular epidemiology of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli in the community and hospital in Korea: emergence of ST131 producing CTX-M-15.* 2012. **12**(1): p. 1-11.

147. Demirci, M., et al., *Detection of O25b-ST131 clone, CTX-M-1 and CTX-M-15 genes via real-time PCR in Escherichia coli strains in patients with UTIs obtained from a university hospital in Istanbul.* 2019. **12**(5): p. 640-644.

148. Can, F., et al., *Emerging Escherichia coli O25b/ST131 clone predicts treatment failure in urinary tract infections.* 2015. **60**(4): p. 523-527.

149. Li, B., et al., *Prevalence and characteristics of ST131 clone among unselected clinical Escherichia coli in a Chinese university hospital.* 2017. **6**(1): p. 1-9.

150. Alqasim, A., A. Abu Jaffal, and A.A.J.I.j.o.m. Alyousef, *Prevalence of multidrug resistance and extended-spectrum β-lactamase carriage of clinical uropathogenic Escherichia coli isolates in Riyadh, Saudi Arabia.* 2018. **2018**.

151. Teramae, M., et al., *Prevalence of Quinolone Resistance of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Escherichia coli with ST131-fimH30 in a City Hospital in Hyogo, Japan.* 2019. **20**(20): p. 5162.

152. Colpan, A., et al., *Escherichia coli Sequence type 131 (ST131) subclone H 30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans.* 2013. **57**(9): p. 1256-1265.

153. ÇİZMECİ, Z., et al., *İdrar ve İdrar Dışı Klinik Örneklerden İzole Edilen GSBL Üreten Escherichia coli İzolatlarında Yüksek Riskli ST131 Klonunun MALDI-TOF MS ve Gerçek Zamanlı PCR ile Araştırılması.* 2018. **52**(1): p. 13-22.

154. Schembri, M.A., et al., *Molecular characterization of the multidrug resistant Escherichia coli ST131 clone.* 2015. **4**(3): p. 422-430.

155. GÜRPINAR, Ö., *Kinolon Dirençli ve Duyarlı İnvaziv Escherichia Coli Kan İzolatlarında St131/H30 Klon/Subklonunun Virülans ile İlişkisi.* 2018.

156. D'Andrea, M.M., et al., *CTX-M-type β-lactamases: a successful story of antibiotic resistance.* 2013. **303**(6-7): p. 305-317.

157. Sherchan, J.B., et al., *Clinical epidemiology and molecular analysis of extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli in Nepal: characteristics of sequence types 131 and 648.* 2015. **59**(6): p. 3424-3432.

184. Güran M. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2014.

ÖZGEÇMİŞ

Adana'nın Seyhan ilçesinde 1976 yılında doğdu. İlköğretimini Denizli İlkokulunda, ortaöğrenimini Necdet Kahraman Ortaokulunda, liseyi Adana Erkek Lisesinde tamamladı. 1994 yılında Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne başladı ve 1997-1998 öğrenim yılında bu bölümden mezun oldu. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek lisans öğrenimine başladı ve 2016 yılında öğrenimini tamamladı.